



**Carlos Jorge  
Figueiredo Simões**

**Inativação fotodinâmica de microrganismos por  
porfirinas catiónicas: influência da carga do  
fotossensibilizador**





**Carlos Jorge  
Figueiredo Simões**

**Inativação fotodinâmica de microrganismos por  
porfirinas catiónicas: influência da carga do  
fotossensibilizador**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, ramo de Biotecnologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professora Auxiliar do Departamento de Química, da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro



## **o júri**

presidente

Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (orientadora)

Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves

Investigadora de Pós-Doutoramento do CESAM do Departamento de Biologia  
da Universidade Aveiro



## **agradecimentos**

Às minhas orientadoras Professora Adelaide Almeida e Amparo Faustino pela orientação científica dada, pela disponibilidade, todo o incentivo e constante ajuda prestada durante, e após o realização deste trabalho.

À Clara Gomes, pela sua constante disponibilidade, paciência e preciosa ajuda na interpretação das várias componentes do trabalho, sendo uma espécie de “co-orientadora”.

Ao João Rodrigues pelo companheirismo, boa disposição e também pela preciosa ajuda na parte laboratorial de Química.

A todos os colegas de laboratório de Química, que de alguma forma contribuíram para compreensão por minha parte do que estava a fazer, em especial à Dora que me acompanhou durante toda a caminhada.

A todas as pessoas do laboratório de Microbiologia, em especial à Carla pela sua incansável disponibilidade, e ajuda.

Aos Departamentos de Química e Biologia da Universidade de Aveiro proporcionarem as condições necessárias para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos meus pais, e ao meu irmão por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem nesta longa, mas mesmo longa e difícil caminhada. Quero agradecer-lhes por todo o apoio, paciência, compreensão, carinho e motivação.

À Sandra por me ter dado a força que faltava e ter trazido outra alegria ao meu dia-a-dia.

Aos meus da Amigos da “CascaHouse”, por me terem aturado tanto ano. E em especial ao Helder Oliveira Casca, por me ter disponibilizado o seu sofá durante vários anos, permitindo dessa forma que eu tenha um curso académico, mas acima de tudo por ser uma pessoa formidável.

A todos os meus colegas de Biotecnologia que me apoiaram durante todos estes anos. Gostava de enumerar alguns/as, mas são muitos e não me quero esquecer de ninguém.





## palavras-chave

Macrociclos tetrapirrólicos, Porfirinas catiónicas, Fotossensibilizadores, Fotoinativação de Microrganismos, Oxigénio Singlete

## resumo

Devido ao alarmante aumento da resistência a antibióticos apresentado por bactérias patogénicas comuns, e à dificuldade no seu tratamento, é necessário encontrar métodos alternativos para controlar estes microrganismos patogénicos.

Um desses métodos é a inativação fotodinâmica (PDI) que tem vindo a ganhar importância como a alternativa aos antibióticos. Este método tem como finalidade controlar as doenças bacterianas e evitar a inativação de bactérias multirresistentes. Embora já se saiba que a presença de carga no fotossensibilizador (PS) tem um papel importante na PDI, o seu efeito na eficiência da fotoinativação bacteriana ainda não foi completamente esclarecido.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a forma como a carga *per se*, bem como a sua localização no macrociclo influencia a eficiência na inativação fotodinâmica em *Escherichia coli*

Para isso foram sintetizadas cinco porfirinas (**1-5**) com o mesmo grupo arilo substituinte nas posições *meso*, e com carga positiva que varia de 1 a 4 cargas. Estes derivados foram caracterizados estruturalmente com o recurso a espectroscopia de ressonância magnética de hidrogénio-1, flúor-19 e carbono-13, assim como a espectrometria de massa e espectroscopia de ultravioleta-visível.

Foram também avaliados alguns parâmetros fotofísicos, como a geração de oxigénio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), fotoestabilidade e agregação dos macrociclos preparados.

Os estudos de fotoinativação bacteriana foram realizados com as porfirinas na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$ , sob irradiação com uma luz branca (380-700nm) com uma irradiância de 40  $\text{W.m}^{-2}$ . Os estudos de inativação da *E. coli* mostraram que os 5 fotossensibilizadores testados apresentam perfis de inativação diferentes.

Este estudo evidenciou que apesar dos fotossensibilizadores testados serem bons geradores de oxigénio singlete e serem fotoestáveis nas condições testadas, características relevantes para o processo fotodinâmico ocorrer, a possibilidade de alguns derivados agregarem em solução (**1a**) e o carácter anfífilo dos fotossensibilizadores devido à localização da carga distinta, são outros dos aspectos a considerar para a eficiência da fotoinativação bacteriana.



## keywords

Tetrapyrrolic macrocycles, Cationic porphyrins, Photosensitizers, Microorganisms photoinactivation, Singlet oxygen

## abstract

Due to the antibiotic resistance in the most common pathogenic bacteria, alternative methods to control pathogenic bacteria are needed. Photodynamic inactivation (PDI) gained increased attention as an alternative modality to antibiotics in order to control bacterial diseases and prevent the spreading of multiresistant bacteria. Although it is well known that PS charge has an important role in PDI, its effect in bacterial photoinactivation efficiency was not yet completely evaluated.

The aim of this study was to evaluate how the charge *per se* influences the efficiency of *Escherichia coli* photoinactivation.

To reach this objective five porphyrin derivatives (1-5) were prepared, bearing the same *meso* aryl substituent group and one to four positive charges. The compounds were characterized through magnetic resonance spectroscopy of hydrogen-1, fluorine-19 and carbon-13, as well as with mass spectrometry and UV-visible.

Some photophysical parameters were also evaluated, such as singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) generation, photostability and aggregation behaviour of the macrocycles.

The photoinactivation studies were performed with porphyrins at concentration of 5.0  $\mu\text{M}$  under white light (380-700nm) irradiation at an irradiance of 40  $\text{W.m}^{-2}$ . The photoinactivation results obtained for the five photosensitizers tested showed different profiles on photoinactivation efficiency. These results highlight that, although the  $^1\text{O}_2$  and photostability are relevant characteristic for the photodynamic process to occur, charge number and distribution as well as aggregation behaviour (1a) and amphiphilicity of the photosensitizers also contribute to the photodynamic inactivation efficiency.



## Índice

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>ix</b>
<b>CAPÍTULO 1: Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Considerações gerais sobre porfirinas .....	3
1.2 Características estruturais .....	4
1.3 Características fotofísicas .....	5
1.4 Síntese de porfirinas <i>meso</i> -substituídas .....	6
1.5 Aplicações dos macrociclos tetrapirrólicos .....	8
1.6 Terapia Fotodinâmica .....	9
1.7 Mecanismo de ação da PDT .....	9
1.7.1 Processos energéticos envolvidos .....	9
1.7.2 Mecanismos de Fotoinativação .....	11
1.8 Aplicações da Terapia Fotodinâmica.....	13
1.9 Fotossensibilizadores usados em PDT .....	14
1.11 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) .....	15
1.11 Diferenças estruturais entre bactérias de Gram positivo e de Gram negativo .....	16
1.12 Alvos celulares da aPDT .....	18
1.13 Fontes de luz usadas em aPDT .....	19
1.14 Vantagens da aPDT relativamente ao uso de antibióticos .....	19
1.15 Efeito da carga do PS na inativação .....	20
1.16 Objetivo .....	21
<b>CAPÍTULO 2: Influence of charge and charge distribution on meso-pentafluorophenylporphyrins in photoinactivation efficiency of <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>23</b>



2.1	Introduction .....	25
2.2	Methods .....	27
2.2.2	Synthesis of Porphyrins 1-3 .....	28
2.2.4	Stock solutions .....	31
2.2.5	Porphyrin solubility studies.....	31
2.2.6	Singlet oxygen generation.....	31
2.2.7	Bacterial growth conditions.....	31
2.2.8	Light source.....	32
2.2.9	Photoinactivation assays .....	32
2.2.10	Photosensitizer binding .....	32
2.2.11	Statistical analysis .....	33
2.3	Results .....	33
2.3.1	Synthesis of porphyrins and precursors.....	33
2.3.2	Porphyrin solubility.....	34
2.3.3	Singlet oxygen generation.....	35
2.3.4	Photosensitizer binding .....	36
2.3.5	Photoinactivation assays of <i>E. coli</i> .....	37
2.4	Discussion .....	38
2.5	Conclusion.....	41
	<b>REFERENCES .....</b>	<b>43</b>

## **Abreviaturas**

aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
IC	Conversão intersistemas
ICS	Cruzamento intersistemas
CPHA	Canadian Public Health Association
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DMF	<i>N,N'</i> - dimetilformamida
DPBF	Difenilisobenzenofurano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Log	Logaritmo de base 10
LPS	Lipopolissacarídeos
PS	Fotossensibilizador
PD	Fotodiagnóstico
PDT	Terapia fotodinâmica
ROS	Espécies reativas de oxigénio
S <sub>0</sub>	Estado fundamental
S <sub>1...n</sub>	Estados singleto excitados



$T_{1\dots n}$	Estados de tripleto
UV-vis	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível



## CAPÍTULO 1

---

*– Introdução –*

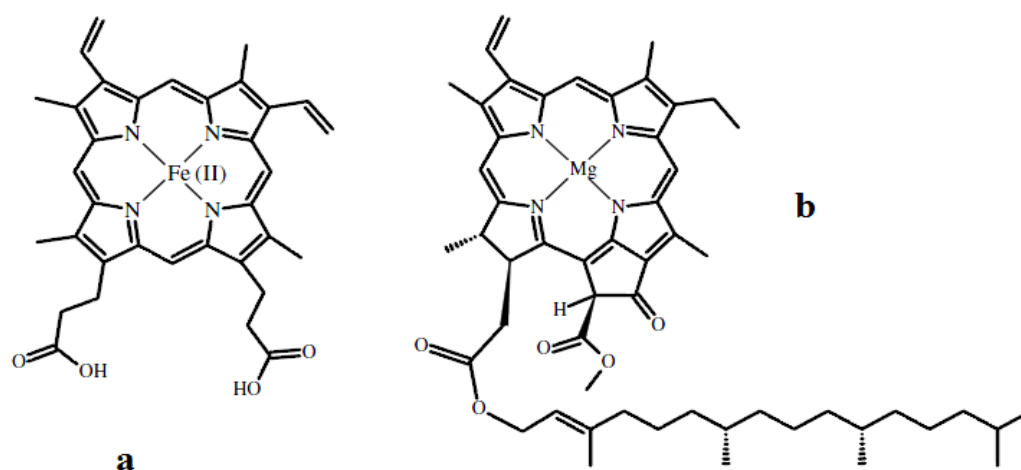




## 1.1 Considerações gerais sobre porfirinas

As porfirinas são moléculas altamente coradas que se encontram em abundância na natureza e desempenham um papel fundamental em diversos processos biológicos como o transporte de elétrons, respiração celular, fotossíntese e em reações enzimáticas. A palavra *porfirina* tem origem na palavra grega “*porphora*” que significa “de cor púrpura”, e encontra-se relacionada com a palavra “*porfíria*”, doença causada por distúrbios na biossíntese do grupo heme presente nos glóbulos vermelhos do sangue, que se manifesta por desordens neurológicas e cutâneas.<sup>1</sup>

Geralmente na natureza as porfirinas, e compostos análogos, apresentam-se na forma de complexos metálicos e estão associadas a proteínas, funcionando como cofatores nos sistemas biológicos de diversos processos bioquímicos, tais como o armazenamento de O<sub>2</sub> (mioglobina), transporte O<sub>2</sub> (hemoglobina), cadeia de transporte de elétrons (citocromo C) e na fotossíntese (clorofila). Estão também presentes em proteínas enzimáticas, como as peroxidases, catalases, vitamina B<sub>12</sub> entre outras. No grupo heme (Fig.1.a) o complexo de ferro da protoporfirina-IX liga reversivelmente o oxigênio molecular, sendo desta forma transportado pela hemoglobina através do sistema circulatório a todas as partes do corpo, ou armazenado pela mioglobina nos seus tecidos. Já na clorofila, os macrociclos tetrapirrólicos envolvidos - a clorofila (Fig.1.b), são do tipo clorina, na qual uma das unidades pirrólicas do macrociclo se encontra reduzida.<sup>1</sup>

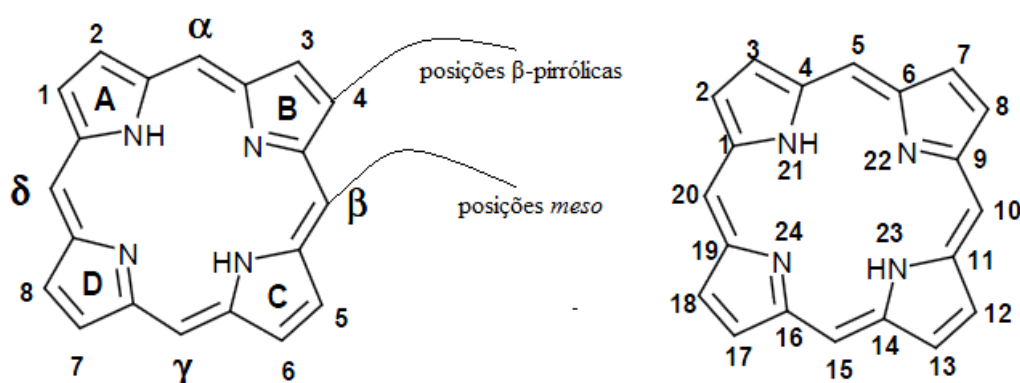


**Figura 1.1-** Estrutura de numeração grupo *heme* na Hemoglobina (a), e da Clorofila A (b).

## 1.2 Características estruturais

As porfirinas e os seus derivados são denominados de compostos tetrapirrólicos uma vez que são constituídos por quatro anéis de tipo pirrol ligados entre si por pontes metínicas (também designadas por posições *meso*), formando assim o macrociclo, que apresenta geometria quadrada plana, constituída por um conjunto de 20 átomos de carbono e 4 átomos de nitrogénio centrais, apresentando geralmente grupos substituintes na periferia do anel que podem alterar/modelar as suas propriedades físico-químicas, como sejam a solubilidade, estabilidade química, fotoquímica e coeficiente de extinção molar.<sup>2</sup>

O macrociclo porfirínico foi proposto pela primeira vez por Küster em 1912, mas só em 1929 Fischer obteve sucesso na sua síntese a partir do pirrol, tendo sido o mesmo o primeiro a atribuir um sistema de nomenclatura às porfirinas.<sup>1</sup> No entanto, dada a dificuldade em identificar muitos dos compostos sintetizados por base na síntese proposta por Fisher, a IUPAC propôs que todos os átomos de carbono do macrociclo fossem numerados de 1 a 20, e que os átomos de nitrogénio apresentassem a numeração maior (21 a 24). Atualmente são aceites as duas formas de nomear os macrociclos tetrapirrólicos, a proposta por Fischer na qual são atribuídas letras a cada anel de tipo pirrol (A, B, C, D), números às posições  $\beta$ -pirrólicas (1-8) e caracteres gregos às posições *meso* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ ) e a proposta pela IUPAC (Fig.1.2).<sup>1</sup>



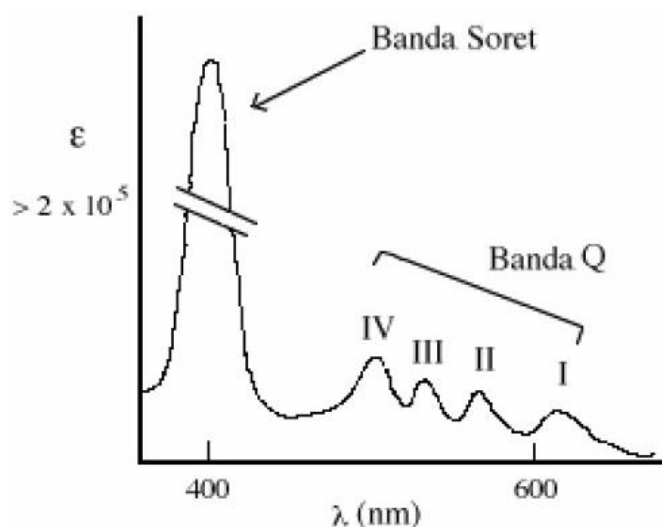
**Figura 1.2** – Sistema de numeração do maclociclo proposta por Fischer (à esquerda) e pela IUPAC (à direita)<sup>1</sup>



### 1.3 Características fotofísicas

Uma das características mais importantes das porfirinas e derivados é o facto de exibirem forte absorção na região do UV-Vis do espectro eletromagnético, o que explica a ocorrência de uma cor intensa. A posição das bandas de absorção podem ser alteradas com a natureza dos grupos substituintes da periferia do anel porfirínico (posições *meso* ou  $\beta$ ), bem como pelo facto do macrociclo estar complexado com um ião metálico ou não, causando mudanças na intensidade e no comprimento de onda em que ocorrem as bandas de absorção.<sup>1</sup>

No caso dos macrociclos tetrapirrólicos de base livre, estes apresentam um espectro de absorção usualmente composto por cinco bandas. Uma banda de absorção intensa entre os 390 e 425 nm, denominada banda Soret, e outras bandas de menor intensidade (normalmente 4) entre os 480 e 650 nm, chamadas de bandas Q (Fig.1.3).<sup>3</sup>



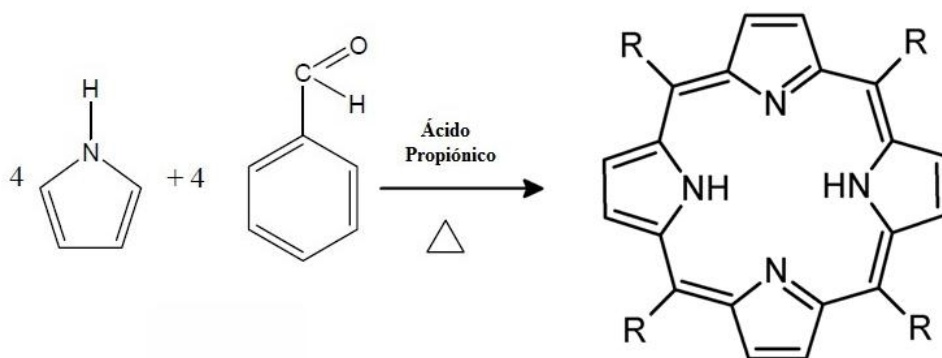
**Figura 1.3-** Espectro de UV-Visível de uma porfirina base livre de tipo “etio”.<sup>1</sup>

Outra característica interessante das porfirinas é o facto de estas emitirem intensamente quando excitadas em quaisquer uma das suas bandas de absorção, sendo assim possível realizar estudos envolvendo emissão (fluorescência e fosforescência) e excitação, os quais podem ser usados para se obter informações sobre a estrutura eletrónica ou a dinâmica dos processos que envolvem os estados excitados singlete S e tripleto T.<sup>4</sup>

## 1.4 Síntese de porfirinas *meso*-substituídas

As porfirinas *meso*-substituídas foram sintetizadas pela primeira vez em 1936 por Rothemund que aqueceu pirrol, benzaldeído e piridina num tubo selado a 150 °C por 24 h, obtendo um rendimento de síntese da *meso*-tetrafenilporfirina inferior a 3%, e encontrando-se o produto obtido contaminado pela correspondente clorina. Dez anos mais tarde Ball e colaboradores ao adicionarem acetato de zinco à mistura reacional obtiveram melhores resultados na preparação de porfirinas, tendo esta modificação sido posteriormente utilizada por Badger e colaboradores para a síntese de diversas *meso*-tetraarilporfirinas substituídas em posição *orto*.<sup>5,6,7</sup>

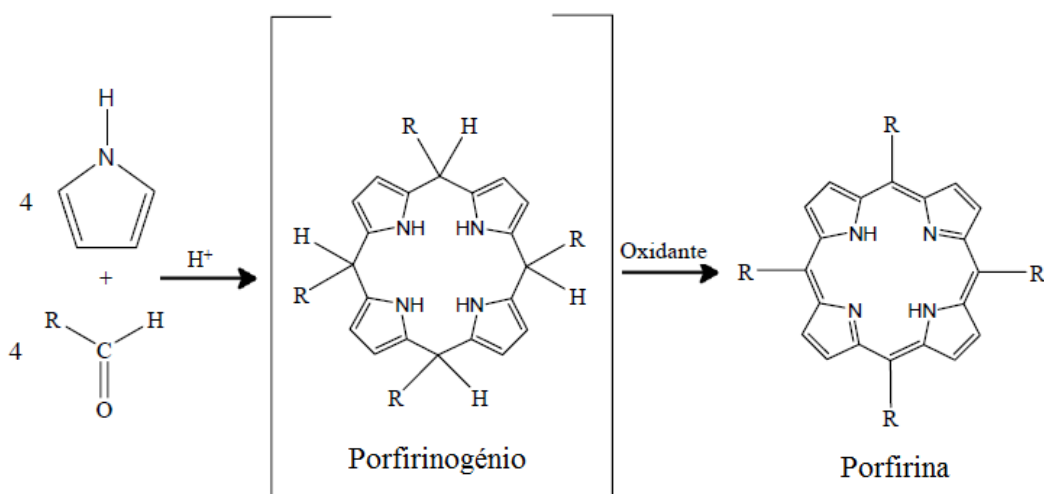
No entanto um avanço considerável seria obtido por Adler e Longo em 1964, quando mostraram que realizando a reação em meio ácido e em sistema aberto, os rendimentos poderiam aumentar consideravelmente.<sup>8</sup> Utilizando ácido propiônico em refluxo, verificaram que obtinham rendimentos de porfirina superiores a 20%, permitindo estas condições o uso de uma variedade de aldeídos substituídos, além da possibilidade de obtenção do produto por cristalização após arrefecimento no meio reacional, facilitando assim o processo de purificação (Fig.1.4).



**Figura 1.4-** Síntese de porfirinas pela condensação entre pirrol e benzaldeído em meio ácido.<sup>1</sup>

Ao longo dos anos foram várias as tentativas de melhoria quer do rendimento de obtenção do macrociclo porfirínico, quer a eliminação da contaminação da porfirina com a correspondente clorina. São de destacar neste sentido dois métodos sintéticos: uma síntese

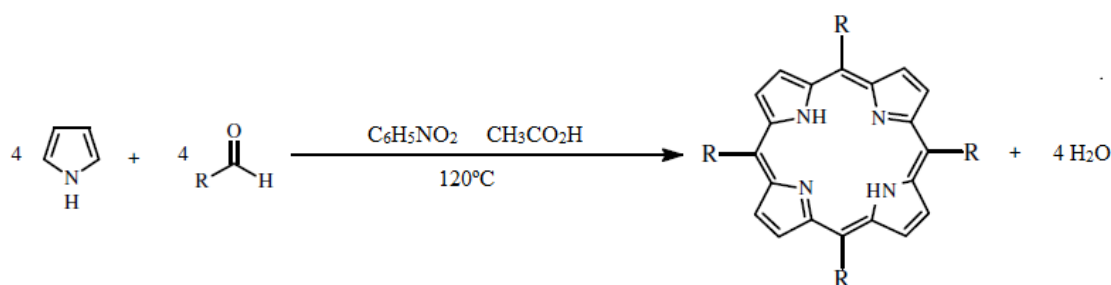
em dois passos propostas por dois grupos quase em simultâneo, o de Lindsey e Rocha Gonsalves, e uma de um passo só proposta pelo grupo de Rocha Gonsalves.<sup>9-11</sup> O método em 2 passos pressupõe, que sob condições de equilíbrio e na presença de um catalisador ácido, a condensação do pirrol com o aldeído ocorra em condições anaeróbias, via formação de porfirinogénio que é posteriormente oxidado a porfirina, por adição de agentes oxidantes como sejam o *p*-cloranil (tetracloro-1,4-benzoquinona) ou a 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) (Fig.1.5)



**Figura 1.5** - Método de Lindsey<sup>9</sup> e Gonçalves<sup>10</sup> para a preparação de porfirinas *meso* substituídas.

Usando este método, mas adicionando à reação solventes clorados (diclorometano, clorofórmio) em condições de elevada diluição e à temperatura ambiente, verificou-se o aumento do rendimento de obtenção de várias porfirinas para valores próximos dos 50%.<sup>9</sup>

A síntese de um passo só proposta por Rocha Gonsalves e colaboradores consiste na condensação do pirrol com o aldeído, na presença de uma mistura de ácido acético ou propiónico com 30% de nitrobenzeno em refluxo durante aproximadamente uma hora.<sup>11</sup> Neste método o ácido tem uma função catalisadora, para além de solvente, e o nitrobenzeno é o agente oxidante do porfirinogénio formado. Neste caso, a porfirina pretendida é obtida sem estar contaminada pela correspondente clorina (Fig.1.6).<sup>11</sup>



**Figura 1.6** - Síntese de porfirina pelo método proposto Gonçalves e colaboradores.<sup>11</sup>

Os métodos atrás descritos têm sido extensivamente utilizados na síntese de inúmeras porfirinas com grupos nas posições *meso* quer simétricas quer assimétricas. As porfirinas *meso*-substituídas assimétricas são preparadas por condensação estatística de pirrol e uma mistura de aldeídos. No final da reação é obtido uma mistura de macrociclos porfirínicos. A título de exemplo se forem utilizados 2 aldeídos podem formar-se até 6 macrociclos diferentes. O controlo estequiométrico dos aldeídos utilizados permite induzir a formação preferencial de um dos macrociclos.<sup>12</sup>

## 1.5 Aplicações dos macrociclos tetrapirrólicos

O facto das porfirinas e derivados já se encontrarem nos sistemas biológicos influencia desde logo a sua importância, daí serem amplamente estudadas e se realizarem inúmeros trabalhos na tentativa de sintetizar porfirinas que “mimetizem” processos que ocorrem na natureza,<sup>13,15</sup> de modo a potencializar as suas funções biológicas. As porfirinas tem sido, por isso, utilizadas nas mais variadíssimas áreas, como a catálise,<sup>16,17</sup> catálise enzimática,<sup>18,19</sup> células fotovoltaicas,<sup>20</sup> cristais líquidos,<sup>21,22</sup> sensores químicos,<sup>13-16,23</sup> sistemas optoelectrónicos,<sup>24-27</sup> e esterilização de água.<sup>27-30</sup> Têm sido também utilizadas para preparar sistemas artificiais de transporte de oxigénio,<sup>31</sup> assim como na esterilização de sangue<sup>32-36</sup> e na fotoinativação de microrganismos como bactérias, fungos e vírus.<sup>33-36</sup> No entanto, é na área da medicina, que têm sido usadas com sucesso quer no diagnóstico - fotodiagnóstico (PD) quer no tratamento de certos tumores - terapia fotodinâmica (PDT).<sup>16,37-39</sup>



## 1.6 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) parte do princípio de que a interação da luz (com um determinado comprimento de onda), com um composto não tóxico (fotossensibilizador) e o oxigénio, resulta em espécies reativas capazes de induzir inviabilidade das células animais, vegetais ou microrganismos, causando a sua morte.<sup>40</sup> Foi inicialmente descoberta em 1897-1898 por Oscar Raab, um aluno do Professor Herman Von Tappeiner, que observou a inativação de *Paramecium caudatum* após a sua exposição à luz na presença do corante laranja de acridina.<sup>4</sup> O Professor, Herman Von Tappeiner desenvolveu os seus estudos e concluiu que, usando baixas concentrações de laranja de acridina, as paramécias morriam na presença de luz visível, mas sobreviviam no escuro. Apenas em 1903 a influência direta da luz no comportamento das paramécias foi posto de parte por Von Tappeiner e Jesionek, “ênfatizando” a necessidade de existir oxigénio no processo e sugerindo o termo de “ação fotodinâmica”. Investigações posteriores realizadas por Hasselbach, usando eritrócitos e corantes, como fotossensibilizadores, demonstraram que a ação fotodinâmica só ocorria na presença de oxigénio.<sup>4</sup>

## 1.7 Mecanismo de ação da PDT

### 1.7.1 Processos energéticos envolvidos

Os eletrões encontram-se preferencialmente no estado de menor energia, correspondendo ao seu estado fundamental ( $S_0$ ), mas através da absorção energética transitam para níveis energéticos mais elevados de estados singleto excitados ( $S_1, S_2, \dots S_n$ ).<sup>41</sup> Neste processo, um dos eletrões é deslocado para uma orbital de maior energia, embora continuem com spins emparelhados.<sup>42,43</sup>

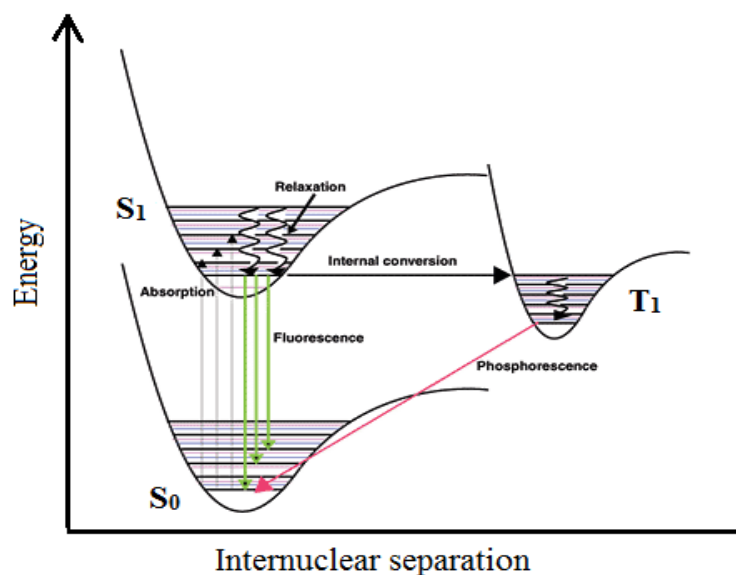
O estado excitado tripleto de menor energia ( $T_1$ ) é obtido principalmente por cruzamento intersistemas (ISC) a partir do menor estado excitado singleto ( $S_1$ ), uma vez que a excitação direta do estado fundamental para o estado tripleto ( $T_1$ ) através da absorção de um fóton é uma transição proibida. Os estados tripleto de maior energia ( $T_2, T_3, \dots T_n$ ) podem ocorrer pela absorção de um fóton pelo eletrão que já se encontra no estado de tripleto de menor energia ( $T_1$ ) (Fig.1.7).<sup>42,43</sup> Uma configuração com maior multiplicidade de spin é mais estável, e desta forma o estado tripleto de uma dada configuração

eletrónica tem uma energia mais baixa que o correspondente estado de singlete. Além disso, de acordo com o Princípio da Exclusão de Pauling, dois eletrões com spins paralelos não podem ocupar a mesma orbital molecular, consequentemente, ficam localizados em regiões diferentes no espaço, reduzindo a repulsão entre eles e diminuindo assim o nível de energia desta nova orbital.<sup>42,43</sup>

Uma molécula excitada é energeticamente instável em relação ao seu estado fundamental.<sup>42</sup> Se a molécula não se rearranjar ou fragmentar, vai arranjar forma de perder energia de maneira a voltar ao seu estado fundamental, existindo alguns processos para que isso ocorra, e onde alguns poderão ser mais favorecidos dependendo do tipo de molécula e da natureza dos estados excitados da mesma.<sup>42</sup> São processos caracterizados por velocidades muito rápidas, sendo normalmente divididos em processos radiativos que envolvem a “desexcitação” por emissão de energia sob a forma de radiação eletromagnética (isto é, luz), não radiativos onde os eletrões dos estados excitados transferem a sua energia a outros de menor energia, sem que haja emissão de radiação eletromagnética e processos de supressão no qual a energia é transferida para outra espécie aceitadora.<sup>44</sup>

Os processos radiativos são também classificados como fenómenos de luminescência, que ocorrem a partir dos estados eletronicamente excitados e geralmente estão divididos em duas categorias, fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado<sup>44</sup> (Fig.1.7). Em estados excitados de singlete, o eletrão excitado, preserva a mesma multiplicidade (spin) que tinha no estado fundamental singlete, dessa forma o seu regresso ao estado fundamental ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) tende a ocorrer de forma muito rápida emitindo neste processo um fóton. Este processo é chamado de fluorescência. No caso da fosforescência, o decaimento dá-se entre estados de diferente multiplicidade de spin, decaindo o eletrão do estado tripleto para o estado fundamental singlete ( $T_1 \rightarrow S_0$ ). É importante ressaltar que tanto na fluorescência, como na fosforescência (considerando que o estado tripleto ocorre por cruzamento intersistema) ocorrem a partir de estados  $S_1$  ou  $T_1$  respetivamente, porque no caso de estados singletos superiores ( $S_2, S_3, \dots S_n$ ) ocorrem usualmente por via não-radiativa (conversão interna).<sup>44,45</sup> No caso das transições não-radiativas, estas envolvem a conversão de um estado eletrónico noutra, sem emissão de radiação eletromagnética.<sup>41</sup> É o caso do processo de conversão interna (CI) que envolve a transferência de eletrões entre estados eletrónicos da mesma multiplicidade de spin, e do

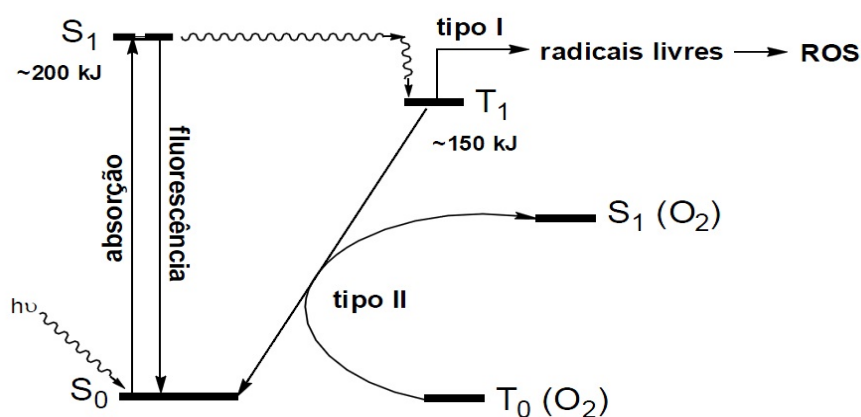
cruzamento intersistemas (ISC), que descreve a transferência de eletrões entre estados com diferentes multiplicidades de spin (Fig.1.7).<sup>41</sup>



**Figura 1.7-** Diagrama de Franck-Condon modificado.<sup>46</sup>

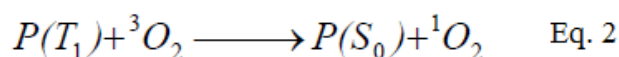
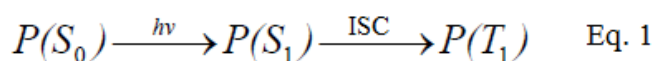
## 1.7.2 Mecanismos de Fotoinativação

Existem dois mecanismos através dos quais a luz na presença de um fotossensibilizador (PS) e oxigénio, pode promover uma reação química num substrato e causar danos num tecido vivo. Esses dois mecanismos são classificados como de Tipo I e Tipo II (Fig.1.8).<sup>4</sup>



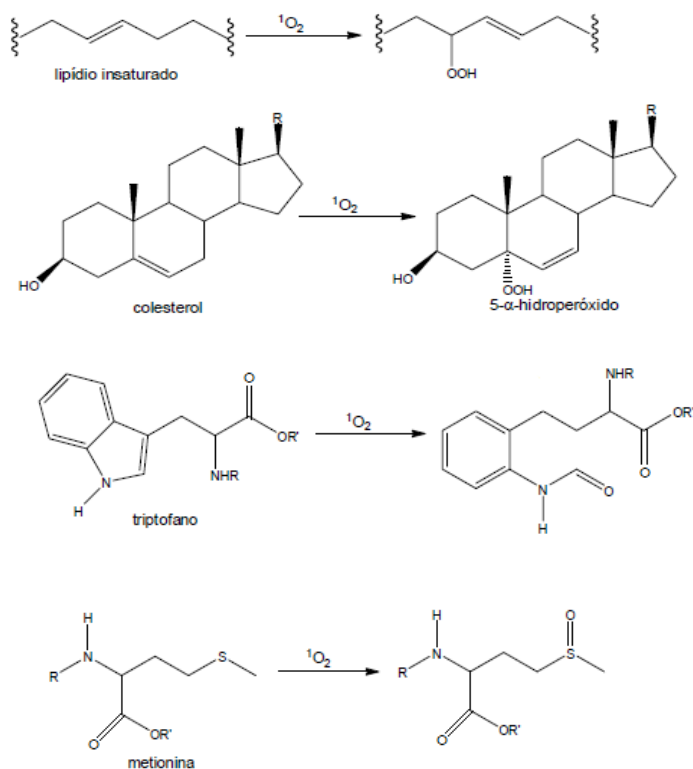
**Figura 1.8** - Diagrama de Jablonski modificado.<sup>4</sup>

- a) No mecanismo de fotoinativação do Tipo I há transferência de eletrões entre o fotossensibilizador no estado tripleto excitado e o substrato ou moléculas de solvente, o que cria radicais ou iões- radicais resultado da transferência de eletrões ou de um átomo de hidrogénio (Fig.1.8). A maioria desses radicais reage instantaneamente com o oxigénio resultando uma variedade de intermediários altamente reativos, os ROS, nomeadamente o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), sendo este último um potente agente oxidante.<sup>4,47</sup>
- b) No mecanismo conhecido por Tipo II, as moléculas do fotossensibilizador excitadas depois de sofrerem cruzamento intersistemas (ISC), ficam no estado excitado de tripleto ( $T_1$ ). O facto do tempo de vida do estado tripleto ser mais longo, permite a ocorrência de colisões efetivas capazes de transferir energia do seu estado tripleto excitado para o oxigénio molecular disponível no tecido ou outros componentes celulares (Fig.1.8).<sup>4,47</sup> O oxigénio é uma das poucas moléculas que no seu estado fundamental, se encontra no estado tripleto e que se encontra presente na maioria das células. Isto permite que a energia proveniente do fotossensibilizador no seu estado excitado tripleto  $P(T_1)$  possa ser transferida para o  $^3O_2$  que passa ao seu estado singleto excitado,  $^1O_2$ , convertendo-se numa espécie citotóxica para os seres vivos visto ser reativa, sendo capaz de reagir com praticamente todos os componentes celulares.<sup>48</sup>



No caso das proteínas os principais alvos do oxigénio singleto, são a cisteína, histidina, metionina, a tirosina e o triptofano. Nos ácidos nucleicos, este reage principalmente com a guanina, e em lípidos a reação dá-se nas ligações insaturadas uma vez que são facilmente oxidáveis. Como resultado dessas modificações fotoquímicas, vai

haver alterações funcionais e estruturais nas células, podendo ocorrer a sua morte (Fig.1.9).<sup>48</sup>



**Figura 1.9-** Reação de oxigénio singlete com algumas Biomoléculas.<sup>48,49</sup>

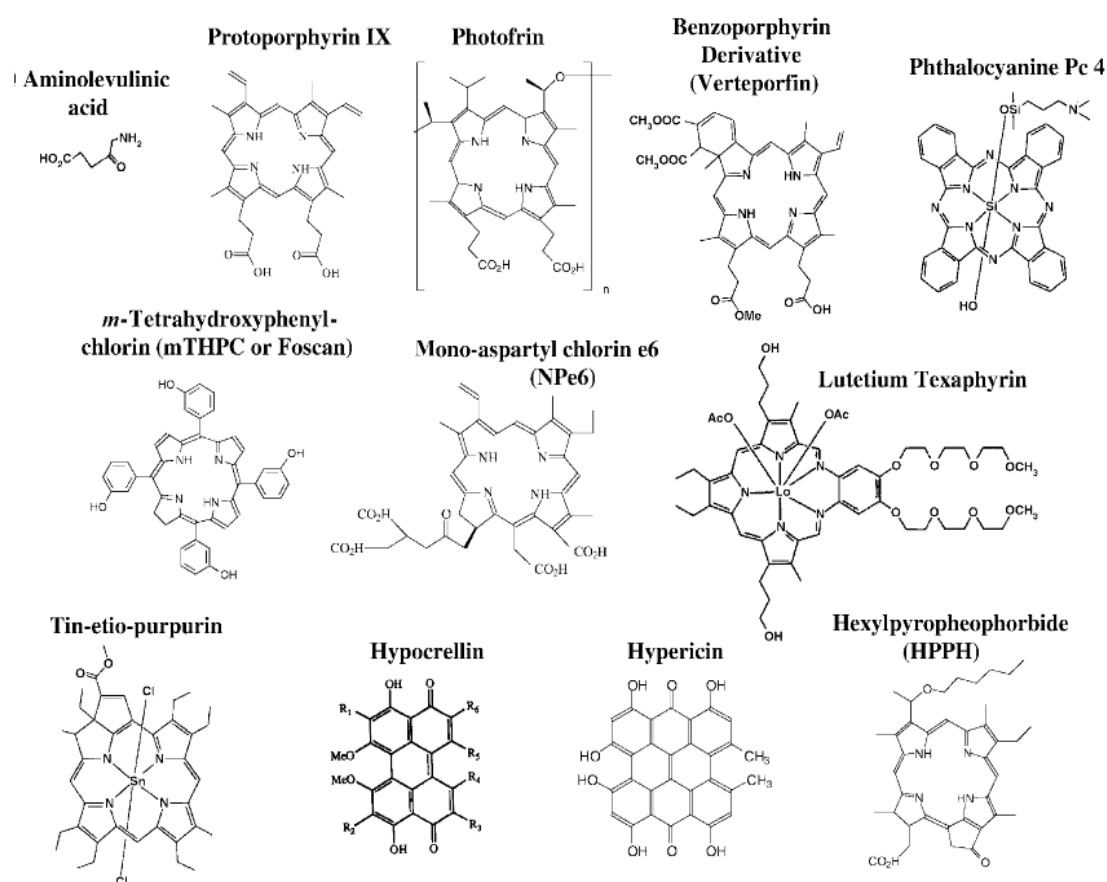
## 1.8 Aplicações da Terapia Fotodinâmica

Embora a PDT tenha sido originalmente desenvolvida com vista ao tratamento de doenças oncológicas tais como cancro do fígado, gastrointestinal, próstata, bem como em tumores cerebrais e cancros de pele,<sup>50,51</sup> tem-se verificado o seu grande potencial no que diz respeito a outras doenças, como é o caso do tratamento de doenças oculares, como a degeneração macular relacionada com a idade, o melanoma de coróide, bem como outros tumores intraoculares.<sup>47,52</sup> É também utilizada em problemas de neovascularização relacionados com o fecho da íris ou da córnea, e também é usada no tratamento basalioma palpebrar.<sup>53</sup> Em condições variadas pode também ser usada na histoplasmólise ocular e idiopatia vascular.<sup>54</sup> Auxilia no transplante de medula óssea e inibe as hiperplasias fúngicas.<sup>55-57</sup> No campo dermatológico, a PDT foi também aprovada para o tratamento de queratoses actínicas. Como consequência muito importante deste facto foi a possibilidade

de extensão da PDT no tratamento de várias doenças não oncológicas, incluindo a prevenção de estenose arterial, hiperplasia prostática benigna ou terapias de desordem autoimunes epidérmicas / patologias dérmicas.<sup>58,59</sup> Também tem vindo a ser usada para o tratamento de infeções microbianas, sendo designada de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT).<sup>58,59</sup>

## 1.9 Fotossensibilizadores usados em PDT

Desde a década de 1970 quando Dougherty usou derivados de hematoporfirina (HpD) como fotossensibilizadores e começou a investigar os mecanismos e aplicações clínicas da PDT,<sup>60</sup> os esforços para encontrar o fotossensibilizador ideal têm ocupado muitos grupos de investigação. Por essa altura já eram conhecidos mais de 400 compostos fotossensibilizadores, incluindo corantes, medicamentos, cosméticos, substâncias naturais, entre outros (Fig.1.10).<sup>61</sup>



**Figura 1.10-** Estruturas de fotossensibilizadores usados em clínica ou em estudos clínicos.<sup>62</sup>

O primeiro composto aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para ser utilizado clinicamente foi o Photofrin<sup>®</sup>, um derivado de hemotoporfirina que apresenta outras variantes comerciais (Phostosan<sup>®</sup>, Photogen<sup>®</sup>, Photocarcinorin<sup>®</sup> e Haematodrex<sup>®</sup>)<sup>63,64</sup> Em razão dos bons resultados obtidos em estudos clínicos, o Photofrin<sup>®</sup> já foi aprovado pelos organismos de saúde de mais de 40 países para o tratamento de diversos tipos de cancro.<sup>64</sup> Atualmente, existem mais três compostos aprovados pela FDA e que estão a ser usados para terapia fotodinâmica: o Visudyne (verteporfirina ou monoácido derivado de benzoporfirina) no tratamento da degeneração macular, o Levulan (ácido aminolevulínico) no tratamento de queratose actínica e o Metvix (aminolevulinato de metilo) no tratamento de queratose actínica e carcinoma basocelular.<sup>62,64-67</sup> O Visudyne também foi aprovado pela European Medicines Agency (EMA) e pela Canadian Public Health Association (CPHA) para o tratamento da degeneração macular,<sup>64</sup> assim como o Foscan [5,10,15,20-tetraquis (3-metoxifenil)clorina] que é usado no tratamento de carcinomas celulares da cabeça e do pescoço.<sup>67</sup>

### 1.11 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

A descoberta da penicilina foi o início da “Idade de Ouro” dos antibióticos, tendo feito a sua estreia clínica em 1940, onde praticamente todas as estirpes de *S. aureus* se mostraram sensíveis a este princípio ativo.<sup>68</sup> Seguiu-se o desenvolvimento de novos antibióticos, como a estreptomicina, cloranfenicol e a tetraciclina na década de 1950, e vários outros que foram usados clinicamente.<sup>68</sup> Mas o aparecimento de resistência à penicilina por bactérias produtoras de penicilases foi reconhecido quase imediatamente após o primeiro teste em pacientes em 1944, e nos anos 50 já 50% de todas as estirpes de *S. aureus* revelaram-se resistentes à penicilina.<sup>69</sup> Em 1960 foi lançada a metecilina e um ano depois, também foi verificado o desenvolvimento de estirpes resistentes de *S. aureus* a esta molécula. Devido à resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos, a vancomicina, um antibiótico glicopeptídico, passou a ser usado em último recurso contra bactérias de Gram-positivo. Contudo, em 1966, o primeiro isolamento clínico de *S. aureus* resistente à metecilina (MRSA), com sensibilidade reduzida contra a vancomicina foi registado no Japão.<sup>70</sup> Hoje em dia, o sucesso do tratamento com antibióticos é notoriamente complicado, devido à existência de uma comunidade resistente à metecilina associada a

estirpes de *S. aureus*. Nestas estirpes o desenvolvimento de resistência está geneticamente relacionado com fatores de virulência, fatores esses que podem levar ao desenvolvimento de infeções.<sup>71,72</sup> Em geral, a resistência aos antibióticos ocorre tipicamente como resultado da inativação/modificação da estrutura alvo da droga, e a acumulação reduzida dos mesmos devido a uma diminuição de permeabilidade da célula bacteriana devido a alterações na parede/membrana celular e/ou aumento de fluxo ativo de agentes antibacterianos da célula.<sup>73,74</sup> Existem hoje em dia muitas estirpes bacterianas patogénicas para o Homem com resistência a antibióticos comuns, como as *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* entre outras.<sup>75</sup>

No que diz respeito à inativação de bactérias, tem sido já mostrado que as bactérias de Gram positivo são mais sensíveis à fotossensibilização, do que as bactérias de Gram negativo. As bactérias de Gram negativo são destruídas de forma eficaz somente após a permeabilidade da membrana externa ser alterada, por pré-tratamento com diferentes produtos químicos (EDTA,  $\text{CaCl}_2$  ou polimixina B),<sup>76</sup> ou pelo uso de fotossensibilizadores catiónicos.<sup>77-79</sup> Esta diferença é explicada pelas diferenças estruturais da parede celular.<sup>80</sup> A presença de grupos funcionais carregados positivamente na estrutura do fotossensibilizador permite uma extensa inativação de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo.<sup>81</sup> A carga positiva dos fotossensibilizadores promove uma forte interação eletrostática com os locais carregados negativamente na superfície externa bacteriana, aumentando a eficiência do processo de fotoinativação.<sup>82</sup> No entanto, o mecanismo de absorção específico do fotossensibilizador pelas bactérias ainda não é totalmente compreendido. Um aspeto importante para o sucesso da fotoinativação bacteriana é a ocorrência de uma ligação entre o fotossensibilizador e a bactéria, especialmente para as bactérias de Gram negativo.<sup>68</sup> A carga positiva do fotossensibilizador parece pois promover uma interação eletrostática forte com as cargas negativas dos lipopolissacarídeos da superfície externa das bactérias de Gram negativo.<sup>68</sup>

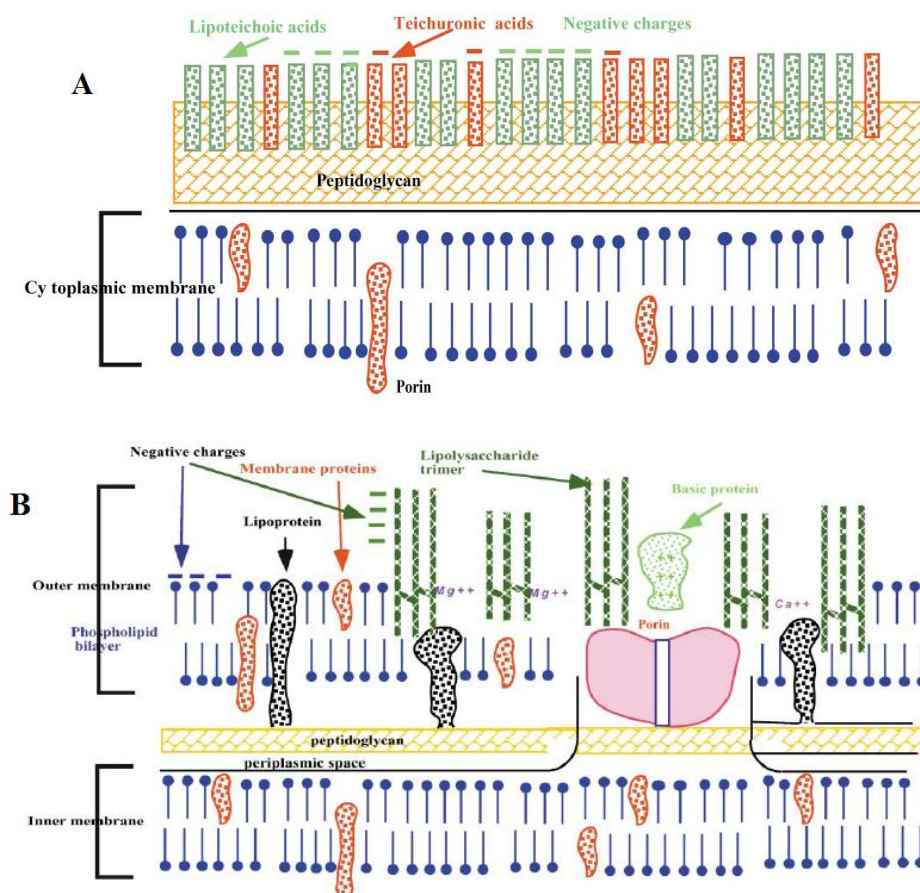
### **1.11 Diferenças estruturais entre bactérias de Gram positivo e de Gram negativo**

As células microbianas são caracterizadas pela grande diferença no que diz respeito à estrutura e organização da parede celular (Fig.1.11), que tem efeitos óbvios na modulação de interação dos fotossensibilizadores exógenos com os constituintes celulares, afetando consequentemente o mecanismo de fotoinativação.<sup>83</sup>



As bactérias de Gram positivo apresentam uma parede celular de peptidoglicano homogénea com uma espessura de 40-80 nm de espessura. Esta camada de peptidoglicano apesar de muito entrelaçada e espessa, não constitui uma barreira, pois apresenta bastante porosidade e, por isso, permeável. Tem sido mostrado que as moléculas de peso molecular na gama dos 30-57 kDa, como polissacarídeos, glicopeptídeos e peptídeos anti-microbianos, podem difundir-se através desta camada.<sup>84,85</sup> Geralmente a resistência contra a penetração de antibióticos está relacionada com mecanismos relativos ao fluxo ativo, alterações no local alvo ou inativação.<sup>86</sup>

Em contraste, as bactérias de Gram negativo apresentam uma parede não homogénea, formada por duas camadas. A camada interna, semelhante à parede das bactérias de Gram positivo mas não tão espessa nem tão entrelaçada. A camada externa apresenta uma estrutura lipídica assimétrica, composta por lipopolissacarídeos fortemente carregados negativamente (LPS), lipoproteínas e proteínas (Fig.1.11).



**Figura 1.11-** Representação esquemática do arranjo da parede celular de bactérias de Gram positivo (A) e de Gram- negativo (B).<sup>38</sup>

Os compostos hidrofílicos podem difundir-se através da membrana externa usando as porinas (proteínas de transporte).<sup>87,88</sup> A membrana externa atua como uma barreira eficaz, tornando as bactérias de Gram negativo mais impermeáveis que as bactérias de Gram positivo.<sup>58</sup> A membrana externa das bactérias de Gram negativo é um local onde se desenvolvem mecanismos de resistência a muitos antibióticos, para os quais as bactérias de Gram positivo são sensíveis.<sup>58</sup>

### 1.12 Alvos celulares da aPDT

Os principais alvos bacterianos da aPDT são os invólucros celulares e o DNA. Já está documentado na literatura que o tratamento de bactérias com vários fotossensibilizadores, conduzem ao aparecimento de danos no DNA. Têm sido detetado que após fotossensibilização com uma vasta gama de fotossensibilizadores, ocorre intercalação do fotossensibilizador nas cadeias de DNA e desaparecimento da forma superenrolada de DNA plasmídico.<sup>89-92</sup> Os derivados de porfirina catiónica, ao interagirem com o DNA aniónico, através de ligação externa e/ou intercalação, causam inativação das células de forma eficaz.<sup>93</sup> Tem-se verificado que os resíduos de guanina são os mais facilmente oxidados.<sup>94</sup> Os danos do DNA, podem, no entanto, ser reparados por vários mecanismos de reparação de DNA, havendo autores que são da opinião que, apesar de ocorrerem danos no DNA, estes não são a principal causa da morte das células bacterianas.<sup>95</sup> Um argumento que tem sido utilizado a favor desta hipótese é que *Deinococcus radiodurans*, uma bactéria que apresenta um mecanismo de reparação de DNA muito eficaz, é facilmente inativada pela terapia fotodinâmica.<sup>96</sup> Desta forma, as alterações na membrana citoplasmática e na parede celular, que conduzem à libertação do conteúdo celular e/ou à inativação dos sistemas de transporte membranares e de enzimas, são as hipóteses mais apoiadas como principais alvos da aPDT.<sup>76,97,98</sup> Estudos recentes utilizando várias estirpes bacterianas de Gram negativo e Gram positivo, verificaram que a composição / organização das estruturas externas bacterianas influenciam a eficiência dos PS na fotoinativação, e que a própria composição química dessas estruturas parece afetar a eficiência da aPDT, mais do que a complexidade e o número de camadas de revestimento externo, sendo os lípidos um dos alvos importantes.<sup>99</sup>

### 1.13 Fontes de luz usadas em aPDT

Foi já testada uma grande variedade de fontes de luz na inativação de microrganismos, desde as lâmpadas básicas de tungsténio até à tecnologia laser.<sup>100</sup> No entanto, em aPDT tem sido mais usadas fontes de luz de potência mais baixa do que os lasers,<sup>100</sup> uma vez que a inativação de microrganismos é facilmente obtida com apenas miliwatts em vez de dezenas ou milhares de watts.<sup>101</sup>

O comprimento de onda necessário para induzir a fotoinativação de microrganismos depende não só da estrutura do fotossensibilizador mas também, da capacidade de absorção de energia.<sup>102</sup> Tem sido verificado em condições laboratoriais que para o mesmo fotossensibilizador, e usando o mesmo organismo, a eficiência fotodinâmica depende também da fonte de luz usada.<sup>99,103,104</sup>

Em estudos de aPDT feitos *in vitro* e em aplicações ambientais, a luz visível artificial tem sido a mais usada.<sup>100</sup> No que diz respeito à luz branca a sua eficiência parece diminuir com o aumento do comprimento de onda.<sup>105,106</sup> A luz azul é mais eficiente na inativação microbiana do que a luz verde ou vermelha. A luz azul é mais fototóxica no comprimento de onda mais curto (< 400-450 nm) do que no mais longo.<sup>106</sup> No entanto apesar de não ser tão eficiente como a luz azul, a luz vermelha penetra de forma mais eficaz nos tecidos, permitindo um tratamento mais eficaz.<sup>100</sup>

A luz solar (100-10<sup>6</sup> nm) tem sido usada na inativação de microrganismos no ambiente, mostrando grande eficácia na aPDT devido ao efeito sinérgico dos raios ultravioleta e infravermelhos.<sup>27,28,30,104</sup> O uso de energia solar pode ser pois uma alternativa económica, nomeadamente em regiões com elevada exposição à radiação solar, podendo ser usada no tratamento por aPDT de águas ambientais contaminadas, como por exemplo na desinfeção de águas de consumo e de águas de pisciculturas.<sup>27,103</sup>

### 1.14 Vantagens da aPDT relativamente ao uso de antibióticos

As bactérias replicam-se rapidamente daí a possibilidade de surgir uma mutação que possa ajudar o microrganismo a sobreviver na presença de um fármaco antimicrobiano, e a tornar-se rapidamente predominante numa população microbiana.<sup>74</sup>

A eficácia de aPDT é independente do perfil de resistência a antibióticos, exibida pelas estirpes microbianas e não foram ainda detetados casos de desenvolvimento de resistências aos fotossensibilizadores.<sup>99,101,107</sup> A principal vantagem da aPDT é o seu amplo espectro de ação, uma vez que o fotossensibilizador pode atuar em bactérias, fungos, leveduras, protozoários e vírus. É também possível usar a aPDT eficazmente sem provocar danos no tecido do hospedeiro, tendo sido verificado que a toxicidade dos PSs é reduzida ou mesmo ausente.<sup>30,108</sup> Nos últimos anos tem sido desenvolvidos fotossensibilizadores ligados a moléculas específicas ou mesmo incorporadas em suportes sólidos inertes, tais como a sílica, membranas de quitosano, magnite revestida de sílica ou nanotubos de carbono, que tem permitido utilizar o fotossensibilizador em áreas específicas, uma vez que a imobilização do PS poderá permitir a eliminação eficiente dos microrganismos durante vários ciclos, assim como a sua remoção completa após o tratamento.<sup>109</sup> A possibilidade de ativação dos fotossensibilizadores através de fontes de luz de baixo custo constitui outra vantagem desta tecnologia para além do seu fácil manuseamento.<sup>83</sup>

### 1.15 Efeito da carga do PS na inativação

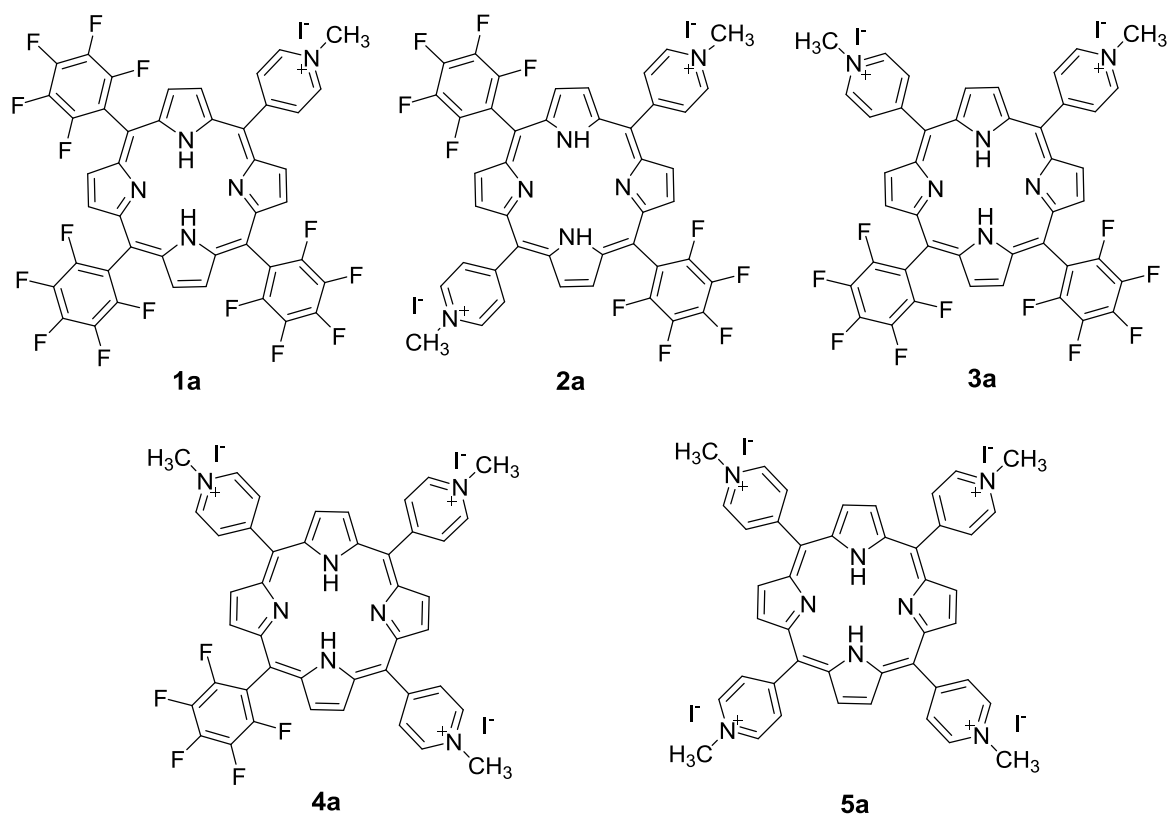
As porfirinas podem ser transformadas em entidades catiónicas através da inserção de grupos substituintes capazes de introduzir nas posições periféricas do macrociclo tetrapirrólico, carga positiva afetando a cinética de inativação e possibilitando a ligação do PS com células microbianas.<sup>83</sup> Tem sido observado que os fotossensibilizadores que possuem carga positiva, podem ligar-se, e penetrar nas células bacterianas, apresentando assim um grau de seletividade na inativação de microrganismos maior que o observado para as células de mamíferos.<sup>110,111</sup> Acredita-se que estas moléculas catiónicas são lentamente absorvidas pelas células do hospedeiro pelo processo de endocitose, enquanto a sua absorção em bactérias parece ser suficiente.<sup>112</sup> Isto está relacionado com o grau de anfifilicidade que estes fotossensibilizadores podem obter tanto pelo número de grupos *meso*-substituídos catiónicos (até quatro), quer pela introdução de cadeias de hidrocarbonetos de diferentes tamanhos.<sup>83</sup> Apesar dos estudos iniciais demonstrarem resultados contraditórios, pois uns estudos revelam que as porfirinas tetra-catiónicas são fotossensibilizadores eficientes tanto na inativação de bactérias de Gram-negativo, como de Gram-positivo usando luz visível,<sup>33</sup> enquanto outros indicam que derivados di- e tri-

catiônicos são mais eficientes que os tetra-catiônicos, tanto contra bactérias de Gram-negativo, como Gram-positivo.<sup>120</sup> Estudos mais recentes indicam que as porfirinas com três e quatro cargas são os fotossensibilizadores mais eficientes contra as duas estirpes bacterianas, onde o que apresenta três cargas revela ser o mais eficiente e promissor.<sup>108</sup>

## 1.16 Objetivo

Alguns estudos têm mostrado que os derivados de porfirinas catiónicas conseguem fotoinativar com elevada eficiência tanto bactérias de Gram positivo, como de Gram negativo, mesmo sem a utilização de agentes disruptores de membranas (ex:  $\text{CaCl}_2$ , EDTA ou polimixina B), fundamentais quando o fotossensibilizador é neutro ou aniônico.<sup>29,114</sup> Já foram testadas diferentes derivados porfirínicos carregados positivamente na fotoinativação de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo com resultados satisfatórios.<sup>77,100,101,108</sup> Alguns estudos comparam a eficiência de porfirinas catiónicas *meso*-substituídas com diferente carga e distribuição (tetra, tri, di e monocatiônica) na inativação bacteriana e mostraram existir diferenças que parecem estar relacionadas quer com o número, quer com a localização das cargas no fotossensibilizador.<sup>30,77,78,103,108,113,115</sup> Porém, nestes estudos os grupos *meso*-substituintes dos diferentes PS testados têm sido diferentes entre si o que dificulta avaliar especificamente o efeito da carga e da sua distribuição na inativação bacteriana.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo principal identificar o efeito do número de carga positiva e sua localização nos fotossensibilizadores na fotoinativação bacteriana em particular em *E. coli* uma bactéria de Gram negativo. Para tal, foram utilizadas porfirinas *meso*-substituídas sintetizadas a partir de dois aldeídos, o pentafluorobenzaldeído e o 4-piridinacarbaldéido, obtendo-se após tratamento com o iodeto de metilo, um conjunto de derivados com diferente número e localização de cargas positiva mantendo o grupo substituinte nas posições *meso* do macrociclo (Fig.1.12).



**Figura 1.12-** Porphirinas catiónicas sintetizadas para a realização deste estudo (**1a**- Mono-Py<sup>+</sup>-Me-PF, **2a**- Di-Py-Me<sup>+</sup>-PFopp, **3a**- Di-Py<sup>+</sup>-Me-PFadj, **4a**- Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, **5a**- Tetra-Py<sup>+</sup>-Me

## CAPÍTULO 2

---

**Influence of charge and charge distribution on *meso*-pentafluorophenylporphyrins in  
photoinactivation efficiency of *Escherichia coli***







## 2.1 Introduction

During the past several decades photodynamic inactivation (PDI) has been reported in the literature to be effective to inactivate efficiently various microorganisms, including bacteria, yeasts, viruses, protozoa,<sup>107-109,116-120</sup> and even drug-resistant strains,<sup>100,107,121</sup> and microorganisms living in biofilms.<sup>122</sup>

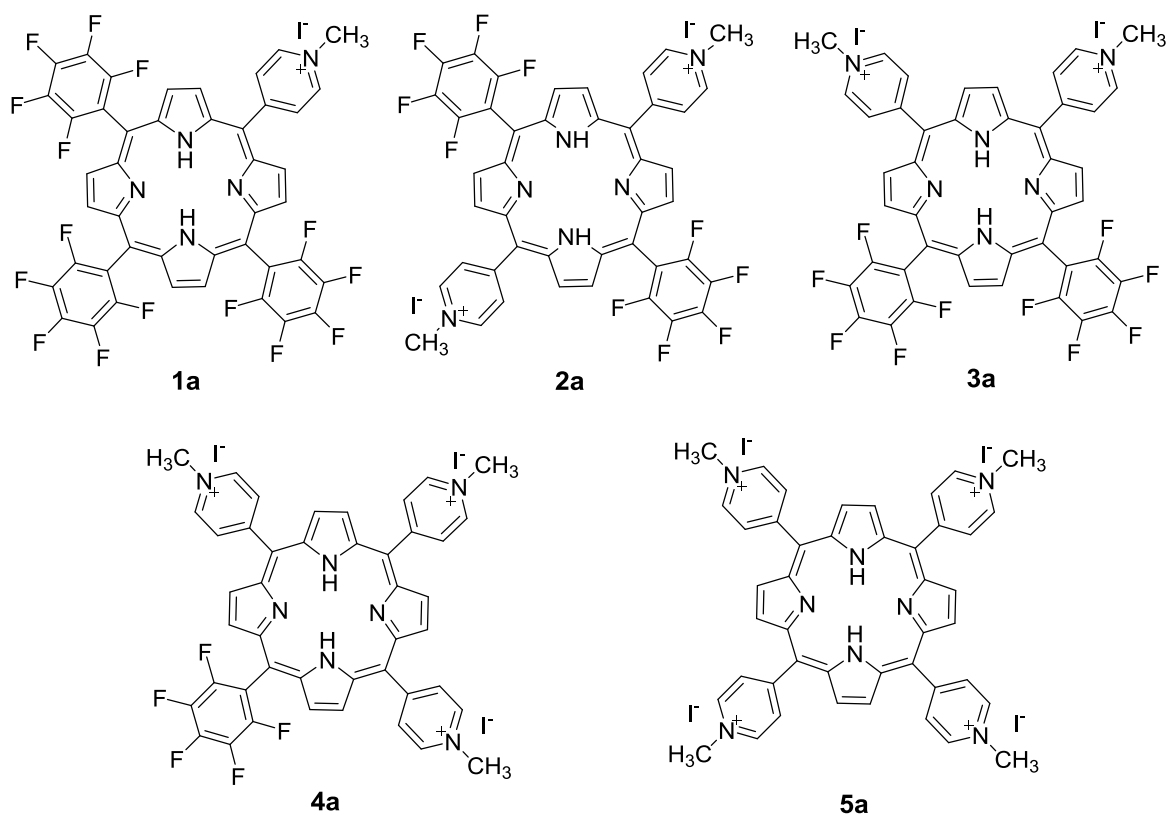
It has been shown that molecular charge is important in determining antibacterial activity. Positively charged photosensitizers (PS) are generally more efficient and can act at lower concentrations than neutral and anionic PS molecules.<sup>30,36,78,82,108</sup> The charge number increase the amphiphilic character of the PS and, consequently, the affinity for bacteria helping a better accumulation in the cells<sup>123,124</sup> accompanied usually by an increase in the photocytotoxic activity. Neutral and anionic PS can efficiently inactivate Gram-positive bacteria because all types of PS easily cross their cell wall. However, these PS are inefficient against Gram-negative bacteria.<sup>93,125</sup> Though, neutral and anionic PS can become effective against Gram-negative bacteria if they are co-administrated with outer membrane disrupting agents (e.g. CaCl<sub>2</sub>, EDTA or polymixin B nonapeptide) which promote electrostatic repulsion with destabilization of the cell wall constituents.<sup>114,126,127</sup> A direct and efficient inactivation of Gram-negative bacteria can be achieved with cationic PS which interacts with the constituents of the outer membrane of the cell wall, easing cell binding.<sup>27,33,93,113</sup>

The number of charge<sup>78,30,124,128</sup> and their distribution in the PS structure affects also the PDI efficiency.<sup>103,129</sup> According to the results by Alves et al (2008) the photodynamic efficiency of cationic porphyrins in the photoinactivation of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* increases with the number of charge in the PS, having the three and four charges PS shown to be highly efficient against both studied bacterial strains. It is also observed for the two studied dicationic porphyrins, varying in charge distribution, that the PS with adjacent charge was significantly more effective than the one with opposite charge in the inactivation of both bacteria. Kessel et al. (2003) had already observed similar results on the photodynamic efficiency of other two di-cationic porphyrins on Murine L 1210 cells, the PS with adjacent charge was significantly more effective than the one with opposite charge in the inactivation of both bacteria. The higher effect of the di-cationic PS with adjacent charges should result on the molecular distortion

due to electrostatic repulsion caused by the asymmetric cationic molecule. In contrast, the porphyrin with the two opposite positive charges is a much more symmetric molecule.<sup>129</sup>

The nature of the meso-substituent groups of the tetrapyrrolic derivatives is also a relevant factor in the outcome of the photosensitization process. The presence of a lipophilic pentafluorophenyl group in one of the *meso* positions of the tetrapyrrolic macrocycle of porphyrins plays an important role on bacterial PDI.<sup>78,103,123,124</sup>

While it is clearly showed that charge number, charge distribution and nature of the meso substituent groups in PS are fundamental in PDI process, it is difficult to evaluate the individual effect of charge in the efficiency of PDI because although in the studies done until now it have been used PS with different charge number, these PS have also different meso substituent groups.<sup>103,108</sup> As far as we know, the effect of charge in the efficiency of bacterial photoinactivation using different positively charged porphyrins with the same *meso* substituent group in the tetrapyrrolic macrocycle is not yet known. The aim of this study was to evaluate how the charge influences of *E. coli*. PDI efficiency. To reach this purpose, five porphyrinic compounds (three of them new ones) with the same *meso* substituent groups in the tetrapyrrolic macrocycle were prepared (Fig. 2.1) and used to evaluate and clarify the charge influence in the PDI of *E.coli*.



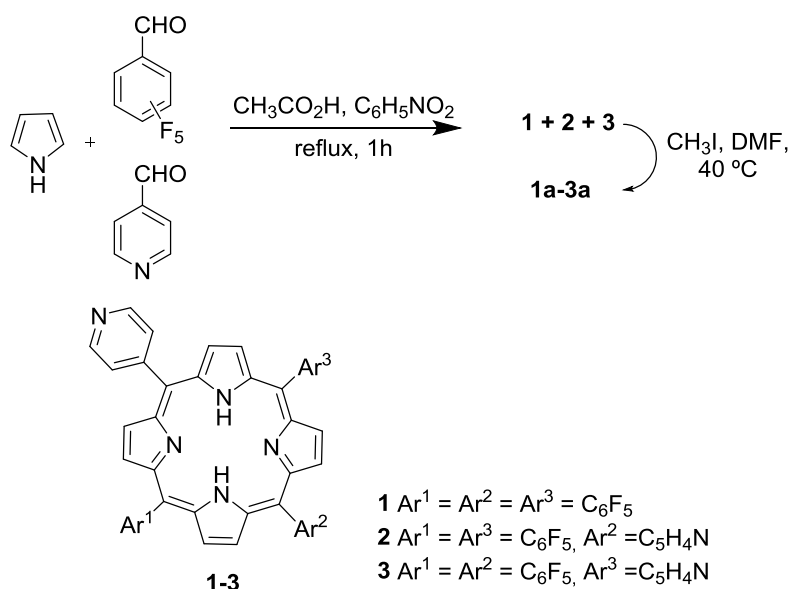
**Figure 2.1** – Chemical structures of each cationic porphyrin used in this study

## 2.2 Methods

### 2.2.1 Photosensitizer synthesis and characterization

5-(1-methylpyridinium-4-yl)-10,15,20-tris(pentafluorophenyl)porphyrin iodide (**1a**), 5,15-bis(1-methylpyridinium-4-yl)-10,20-bis(pentafluorophenyl)porphyrin di-iodide (**2a**), 5,10-bis(1-methylpyridinium-4-yl)-15,20-bis(pentafluorophenyl)porphyrin di-iodide (**3a**), 5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-20-pentafluorophenylporphyrin tri-iodide (**4a**) and 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetra-iodide (**5a**), (Fig.2.1) were synthesized according to previously described procedures<sup>130</sup> or as describe below from the Rothmund reactions using pyrrole and the appropriate aldehydes (pyridine-4carbaldehyde and pentafluorophenylbenzaldehyde) (Scheme 2.1). <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>19</sup>F solution NMR spectra were analysed on a BrukerAvance-300 spectrometer at 300.13, 75.47 and 282.38 MHz, respectively. CDCl<sub>3</sub> and DMSO-d<sub>6</sub> were used as solvents and TMS as internal reference; the chemical shifts are expressed in δ (ppm) and the coupling constants (J) in Hertz (Hz). Mass spectra were recorded on a MALDI-TOF/TOF 4800 Applied Biosystems. UV–Vis spectra were obtained on a Shimadzu UV-2501PC spectrophotometer. Steady-state

fluorescence spectra of the investigated compounds were measured in 1×1 cm quartz optical cells with a computer controlled Jobin-Yvon FluoroMax-3 spectrofluorometer with slits of 2.0 nm. Column chromatography was carried out using silica gel (Merck, 35-70 mesh). All chemicals were supplied by Sigma–Aldrich.



Scheme 2.1- Synthetic routes used to prepare the novel cationic porphyrins derivatives using pyrrole and pyridine-4-carbaldehyde and pentafluorobenzaldehyde.

## 2.2.2 Synthesis of Porphyrins 1-3

To a mixture of acetic acid (150 mL) and nitrobenzene (70 mL) in reflux, it was added pyridine-4-carbaldehyde (1.4 mL; 14.7 mmol) and pentafluorobenzaldehyde (1.8 mL; 14.6 mmol). Thereafter, 2 mL of pyrrole (28.8 mmol) was added drop-by-drop. The reaction mixture was kept under stirring during 1 h. Afterwards, the reaction was cooled and nitrobenzene and acetic acid was distilled under pressure. The crude material was retaken in dichloromethane and subjected to chromatography using a mixture of dichloromethane/methanol (98:2) as eluent. The desired compounds were crystallized from a mixture of dichloromethane / methanol.

Porphyrin **1**: 0,51%,  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  -3,18 (s, 2H, NH), 9.07 (d, 2H,  $J = 5.7$  Hz, o-Py), 9.17 (d, 2H,  $J = 5.7$  Hz, m-Py), 9,38-9,50 (m, 8H,  $\beta$ -H).  $^{19}\text{F}$  NMR:  $\delta$  -159.88 – -160.39 (m, 6F, o-F), -174.94 (t, 3F,  $J = 21.1$  Hz), -184.60 – -185.21 (m, 6F, m-F)  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  103.4, 103.9,

115.2, 115.3, 115.5, 115.6, 116.6, 124.8, 130.8, 136.5, 136.6, 136.7, 138.5, 138.6, 138.8, 141.2, 141.35, 141.45, 143.4, 145.6, 147.5, 155.2; UV-vis (DMSO)  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon$ ) 414 (5.60), 507 (4.41), 580 (3.91); MALDI-MS  $m/z$ : 866.2 [ $M^+$ ]

Porphyrin **2**: 0,10%,  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  -3,15 (s, 2H, NH), 9.06 (d, 4H,  $J = 5.7$  Hz, o-Py), 9.17 (d, 4H,  $J = 5.7$  Hz, m-Py), 9.45 (d,  $J = 6.6$  Hz, 8H,  $\beta$ -H)  $^{19}\text{F}$  NMR:  $\delta$  -160.26 (dd, 4F,  $J = 21.8$  e 8.5 Hz, o-F), -175.13 (t, 2F,  $J = 21.8$  Hz), -184.76 – -185.27 (m, 4F, m-F)  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  103.1, 115.8, 115.91, 115.93, 116.05, 116.09, 118.2, 124.9, 129.4, 130.5, 132.2, 136.5, 136.6, 136.7, 138.5, 138.6, 138.7, 141.2, 143.2, 145.6, 147.5, 148.1, 149.8; MALDI-MS  $m/z$ : 796.2 [ $M^+$ ]; UV-vis (DMSO)  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon$ ) 417 (5.53), 510 (4.36), 583 (3.84)

Porphyrin **3**: 0,18%,  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  -2.92 (s, 2H, NH), 8.18 (dd, 4H,  $J = 4.4$  e 1.5 Hz, o-Py), 8.89 (dd, 8H,  $J = 14.7$  e 4.8 Hz,  $\beta$ -H), 9.08 (dd,  $J = 4.4$  e 1.5 Hz, 4H, m-Py).  $^{19}\text{F}$  NMR:  $\delta$  -160.40 (dd, 4F,  $J = 22.5$  e 8.0 Hz, o-F), -175.13 (t, 2F,  $J = 22.5$  Hz), -184.73, -185.27 (m, 4F, m-F).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  102.3, 115.7, 115.8, 115.9, 119.0, 129.4, 131.4, 136.4, 136.6, 137.7, 141.1, 141.2, 143.2, 145.51, 145.54, 145.58, 145.64, 145.6, 147.5, 147.46, 147.49, 147.52, 147.55, 147.62, 148.1, 149.9; UV-vis (DMSO)  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon$ ) 417 (5.60) 510 (4.35) 583 (3.86); MALDI-MS  $m/z$ : 796.2 [ $M^+$ ]

### 2.2.3 General procedure for porphyrin *N*-methylation.

A large excess of iodomethane was added to a stirred solution or suspension of porphyrin **1–3** in dry dimethylformamide (DMF) (5 mL per 25 mg of porphyrin) and the reaction mixture was heated at 40 °C, in a closed flask. When the reaction was complete, the mixture was cooled, diethyl ether was added and the methylated porphyrin (**1a–3a**) was precipitated. The solid was filtered and washed with diethyl ether. The compound was then dissolved in methanol–water (1:1) and, after concentration, re-precipitated from water–acetone. The methylated products were dried under reduced pressure. All compounds were obtained with quantitative yields and their purities were confirmed by thin layer chromatography, by  $^1\text{H}$  NMR and mass spectroscopies.

Porphyrin **1a**  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  -3.19 (s, 2H, NH); 4.72 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 9.09 (d,  $J = 6.2$ , 2H, Py-*o*-H), 9.16 (d,  $J = 4.9$ , 2H,  $\beta$ -H), 9.44 (brs, 6H,  $\beta$ -H), 9.49 (d,  $J = 6.2$ , 2H, Py-*m*-H);  $^{19}\text{F}$  NMR:  $\delta$  -162.46 – -162.66 (m, 6F, *o*-F), -176.92 (t, 3F,  $J = 22.5$ , 3F, *p*-F), -185.64 – -185.63 (m,

6F, *m*-F);  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  47.8 ( $\text{CH}_3$ ), 102.9, 103.4, 114.2, 114.4, 114.6, 114.7, 116.1, 132.2, 136.4, 136.6, 136.7, 138.4, 138.5, 138.7, 140.95, 140.99, 143.0, 144.1, 145.1, 145.2, 147.10, 147.14, 156.2, 162.3, UV-vis (DMSO)  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon$ ) 414 (5.36), 507 (4.46), 582 (3.96), 633 (2.52); HRMS-ESI  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{44}\text{H}_{17}\text{F}_{15}\text{N}_5\text{I}$   $[\text{M-I}]^+$ : 900.12389 found: 900.12267.

Porphyrin **2a**  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  -3.15 (s, 2H, NH); 4.72 (s, 6H,  $2\text{CH}_3$ ); 9.08 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H, Py-*o*-H); 9.18 (d,  $J = 4.7$  Hz, 6H,  $\beta$ -H), 9.45 (d,  $J = 4.7$ , 6H,  $\beta$ -H), 9.49 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H, Py-*m*-H).  $^{19}\text{F}$  NMR:  $\delta$  -162.70 (dd,  $J = 25.1$  e 6.4 Hz, 4F, *o*-F), -176.8 (t,  $J = 22.5$  Hz, 2F, *p*-F), -185.62 – -185.81 (m, 4F, *m*-F);  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  47.8 ( $\text{CH}_3$ ), 103.4, 114.4, 114.6, 114.8, 115.7, 132.2, 136.4, 136.5, 136.6, 138.4, 138.5, 138.6, 141.0, 141.1, 142.9, 143.0, 144.1, 145.2, 147.06, 147.14, 156.2; UV-vis (DMSO)  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon$ ) 417 (5.61), 510 (4.47), 542 (3.71), 583 (4.00), 648 (3.20); HRMS-ESI  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{44}\text{H}_{24}\text{F}_{10}\text{N}_6\text{I}_2$   $[\text{M-2I}]^{2+}$ : 413.09459, found: 413.09430.

Porphyrin **3a**  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  -3.15 (s, 2H, NH), 4.72 (s, 6H,  $2\text{CH}_3$ ) 9.05 (d,  $J = 6.7$ , 4H, Py-*o*-H); 9.18 (brs, 4H,  $\beta$ -H), 9.18 (brs, 4H,  $\beta$ -H), 9.49 (d,  $J = 6.7$  Hz, 4H, Py-*m*-H);  $^{19}\text{F}$  NMR:  $\delta$  -162.62 (dd,  $J = 25.2$  and 6.6 Hz, 4F, *o*-F), -176.89 (t,  $J = 22.5$  Hz, 2F, *p*-F), -184.73 – -185.27 (m, 4F, *m*-F);  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  47.9 ( $\text{CH}_3$ ), 103.0, 114.3, 114.4, 114.49, 114.52, 114.6, 114.7, 116.2, 132.2, 136.5, 136.57, 136.62, 136.7, 138.4, 138.6, 138.7, 141.0, 143.0, 144.2, 145.16, 145.20, 145.24, 145.28, 145.31, 147.0, 147.1, 147.16, 147.23, 156.3; UV-vis (DMSO)  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon$ ) 417 (5.55), 510 (4.30), 582 (3.96), 633 (2.60); HRMS-ESI  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{44}\text{H}_{24}\text{F}_{10}\text{N}_6\text{I}_2$   $[\text{M-2I}]^{2+}$ : 413.09459, found: 413.09432.

**Porphyrins 4a and 5a.** These porphyrins were synthesised according the literature procedures.<sup>119,131</sup> After purification and purities confirmed of products by thin layer chromatography, they were analyzed by UV-vis and  $^1\text{H}$  NMR and the spectra were also consistent with literature data for this two compounds.

[**4a**]:  $^1\text{H}$  NMR: -3.13 (s, 2H, NH), 4.72 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 8.99-9.47 (m, 20 H, Py-H,  $\beta$ -H). UV-vis (DMSO):  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 422 (5.48), 485 (3.85) 513 (4.30), 545 (3.70), 640 (3.14).

[**5a**]:  $^1\text{H}$  NMR: -3.12 (s, 2H, NH), 4.73 (s, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 9.00 (d,  $J = 6.5$  Hz, 8H, Py-*o*-H), 9.22 (s, 8H,  $\beta$ -H), 9.49 (d,  $J = 6.5$  Hz, 8H, Py-*m*-H). UV-vis (DMSO) :  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 425 (5.43), 516 (4.29), 549 (3.77), 588 (3.84), 642 (3.30).

#### 2.2.4 Stock solutions

Stock solutions (500  $\mu\text{M}$ ) of each porphyrin in dimethyl sulfoxide (DMSO) were prepared by dissolving the adequate amount of the desired porphyrin in a known volume. For biological assays, the stock solutions of photosensitizers were diluted to the final concentrations in phosphate buffered saline (PBS, 4 g of NaCl, 0.1 g of KCl, 0.72 g of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.12 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  to a final volume of 500 mL and pH  $7.4 \pm 0.2$ ).

#### 2.2.5 Porphyrin solubility studies.

The solubility of five cationic porphyrins (**1a** – **5a**) in PBS was assessed by UV-Visible spectroscopy. Concentrations between 0.5 and 6.0  $\mu\text{M}$ , obtained by the addition of aliquots of each porphyrin stock solution, were analysed. The intensity of the Soret band versus porphyrin concentration was plotted in a plot for linear regression, in order to determine if these concentrations follow the Beer-Lambert law.

#### 2.2.6 Singlet oxygen generation

Stock solutions of each porphyrin derivative at 500  $\mu\text{M}$  in DMSO and a stock solution of 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) at 10 mM in DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (9:1) were prepared. A solution of the porphyrin (0.5  $\mu\text{M}$ ) and DPBF (50  $\mu\text{M}$ ) in DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (9:1) were irradiated in a glass cuvette (3 mL), at room temperature and under gentle magnetic stirring, for different periods of time, with white light filtered through a cut-off filter for wavelengths below 540 nm, at an irradiance of  $9.0 \text{ mW cm}^{-2}$ . The absorption decay of DPBF at 415 nm was measured at irradiation intervals (1 min) up to 15 min. The production of singlet oxygen was evaluated qualitatively through the DPBF, a singlet oxygen quencher. The percentage of the DPBF absorption decay, proportional to the production of  $^1\text{O}_2$ , was assessed by the difference between the initial absorbance and the absorbance after a given period of irradiation.

#### 2.2.7 Bacterial growth conditions

*E. coli* (ATCC 13706) from fresh cultured plates was inoculated in tryptic soy broth (TSB, Merck) and grew aerobically overnight at 37 °C under 130 rpm. Then, an aliquot

was transferred into fresh liquid medium at the same growth conditions to reach the early stationary phase ( $\approx 10^9$  colony forming units – CFU mL<sup>-1</sup>).

#### 2.2.8 Light source

The effect of charge and charge distribution of the 5 porphyrins at concentration of 5.0  $\mu$ M) was evaluated by exposing a bacterial suspension in laboratory conditions to white light (PAR radiation, 13 lamps OSRAM 21 of 18 W each one, 380–700 nm) with an irradiance of 40 W m<sup>-2</sup> at defined times. The light irradiance was measured with a radiometer LI-COR Model LI-250.

#### 2.2.9 Photoinactivation assays

Bacterial cultures, from the early stationary phase cultures, were tenfold diluted in PBS to a final bacterial concentration of  $\approx 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>. The bacterial suspensions were distributed in 250 mL beakers (final volume of 15 mL per beaker), incubated in the dark with 5.0  $\mu$ M of PS 15 min at 37 °C under 130 rpm stirring, in order to promote the PS binding to cells, and then exposed to white light. Bacterial suspensions were irradiated up to 270 min (total light dose of 64.8 J cm<sup>-2</sup>) and sub-samples of 1.0 mL were collected at the beginning of the irradiation (time 0) and after 15, 30, 60, 90, 180 and 270 min of light exposure. After each photosensitization period, the cells were serially diluted in PBS, pour plated in Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) and incubated, according the conditions described above, for viability monitoring. The cell viability was determined by counting the CFU on the most appropriate dilution. Control samples were included in all PDI experiments: light control (LC) consisted of a bacterial suspension that was exposed in parallel to white light; and dark control (DC) consisted of a bacterial suspension incubated with PS in the same conditions as the samples, but protected from light by an aluminium foil. Three independent experiments were conducted, with two replicates each.

#### 2.2.10 Photosensitizer binding

A bacterial suspension ( $\approx 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>) was incubated for 15 min in the dark at room temperature in the presence of each PS (**1a** – **5a**) at the same concentration used in the inactivation studies (5.0  $\mu$ M). The unbound PS was removed out of the suspension by



centrifugation at 17,000 g for 15 min (Eppendorf Microcentrifuge 5414). The pellets were washed with PBS and then centrifuged at the same conditions. For the digestion, the pellets were re-suspended in 1 mL of a digestion solution (2% sodium dodecyl sulphate/0.1 M NaOH)<sup>36</sup> and incubated at room temperature for at least 24 h.

The concentration of each PS, in the digested extracts, was analysed by fluorescence with a Fluoromax 3 (Horiba Jobin-Yvon). The samples were excited at 423 nm and the fluorescence emission of the PS was monitored in the 600–800 nm range. The measured fluorescence intensity allowed the determination of the corresponding concentration by interpolation with a calibration plot built with known concentrations of the each PS. Parallel aliquots of the bacteria incubated in the presence of the PS were serially diluted and pour plated for the determination of the concentration of viable bacteria (CFU mL<sup>-1</sup>). The number of PS molecules/cell was calculated according to the literature.<sup>36</sup> Three independent assays were performed, with three replicates each.

#### 2.2.11 Statistical analysis

Statistical analyses were performed by using SPSS (SPSS 15.0 for Windows, SPSS Inc., USA). Normal distributions were assessed by Kolmogorov-Smirnov test. The significance of all porphyrins (**1a** – **5a**) and irradiation time on bacterial inactivation was assessed by two-way univariate analysis of variance (ANOVA) model with the Bonferroni *post-hoc* test. A value of  $p < 0.05$  was considered as significant.

### 2.3 Results

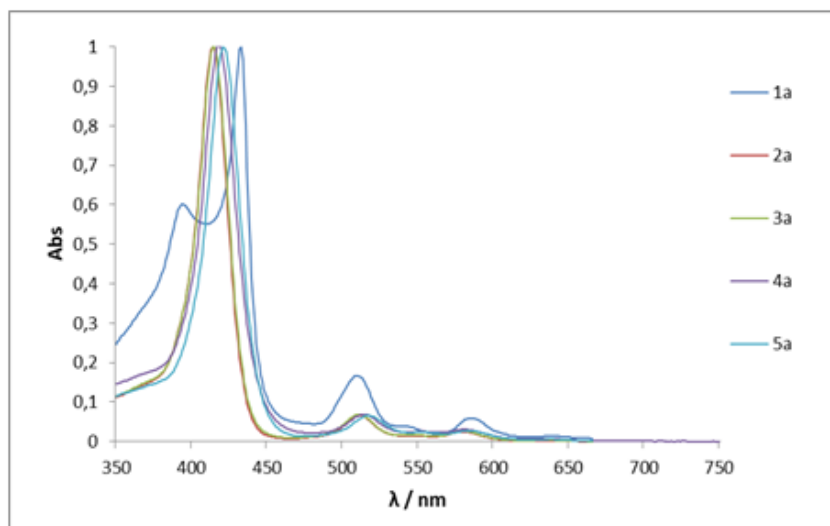
#### 2.3.1 Synthesis of porphyrins and precursors

The synthetic routes used to prepare the novel cationic porphyrins derivatives (**1a** – **3a**) involved the previous preparation of the adequate neutral precursors **1** – **3** (Scheme 2.1), obtained directly from a crossed Rothmund reaction using pyrrole and pyridine-4-carbaldehyde and pentafluorophenylbenzaldehyde. The crude mixture, free of reaction solvents, was object of careful chromatographic purification in order to obtain the desired derivatives **1-3**. The methylation of these porphyrins was carried out in the presence of a

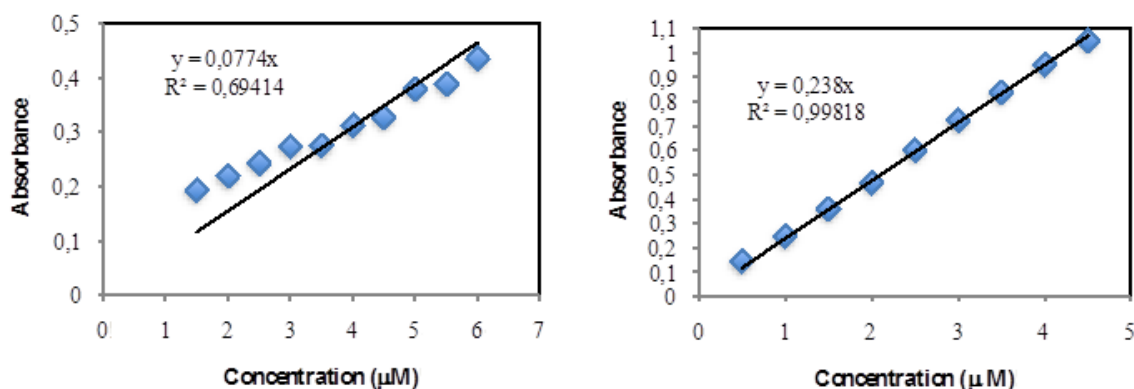
large excess of methyl iodide in DMF at 40 °C, overnight, followed by precipitation with diethyl ether giving rise to compounds **1a** – **3a**. All the new porphyrins were fully characterized by spectroscopic data and showed UV-Vis spectra of "Etio" type, typical of this type of derivatives (Fig. 2.2).

### 2.3.2 Porphyrin solubility

The porphyrins solubility in DMSO and PBS were measured by UV-visible spectroscopy in concentrations between 0.5 and 6.0  $\mu\text{M}$  in order to determine if these compounds, at this concentration range, follows the Beer-Lambert law and no aggregation phenomena occurs. The results obtained from the plotting of the Soret band intensity *versus* porphyrin concentration in PBS show two different behaviours. Cationic compounds **2a-5a** show a linear regression, as shown for compound **3a**, confirming that, no aggregation phenomenon occurs for these compounds with the concentration increase, in the studied concentration range (Fig. 2.3). However compound **1a** shows under the same conditions a very poor regression coefficient for a linear regression, which is suggestion of occurrence of aggregation under the studied conditions (Fig. 2.3).



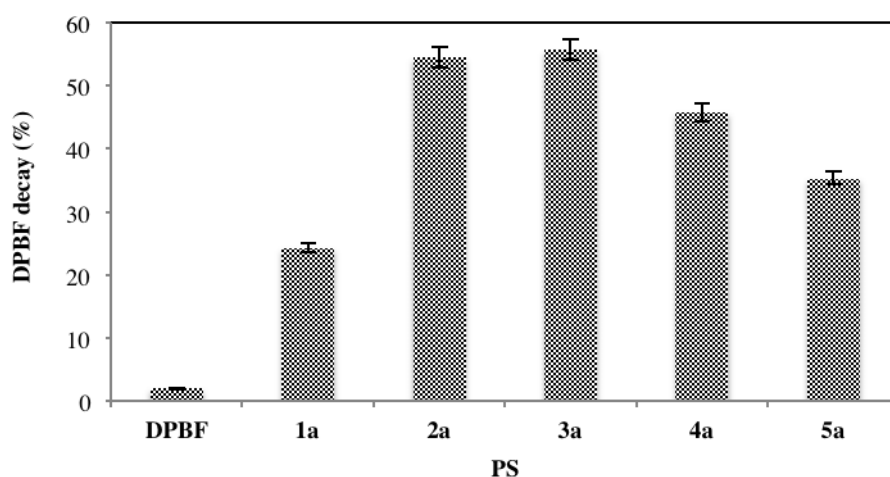
**Figure 2.2.** – Normalized absorbance spectra in PBS of PS **1a-5a**



**Figure 2.3** - Linear regression graphics plotted from the Soret band absorbances at upper 433 nm (**1a**) and bottom 414 nm (**3a**) versus the PS concentrations in PBS.

### 2.3.3 Singlet oxygen generation

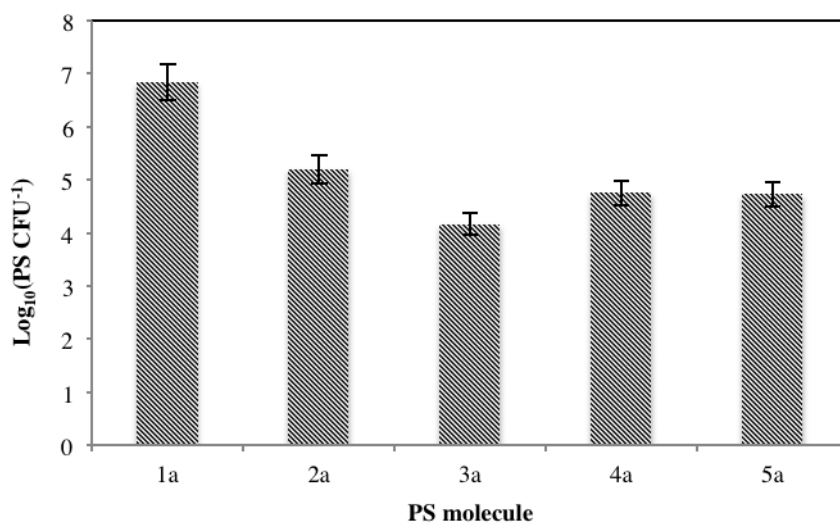
The results, summarized in Figure 2.4, show that the photodegradation of 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) was highly enhanced in the presence of the PS. All five cationic porphyrins are able to generate  $^1\text{O}_2$ , causing photodegradation of DPBF (Figure 2.3), however, the DPBF decay is PS dependent, following the order: **1a** (mono charged) < **5a** (tetra charged) < **4a** (tri charged) < **2a** = **3a** (two charged). The PS with two positive charges (**2a** and **3a**) caused similar DPBF decay ( $\approx 55\%$  reduction of DPBF absorption) after 15 min of irradiation (ANOVA,  $p > 0.05$ ), indicating the higher  $^1\text{O}_2$  rate production by all tested PS. The tri-cationic derivative **4a** was the PS that caused the second highest (ANOVA,  $p < 0.05$ ) DPBF decay (46%) after the same irradiation period, showing a significantly lower DPBF decay than both di-cationic PS (ANOVA,  $p < 0.05$ ), but a significant higher (ANOVA,  $p < 0.05$ ) DPBF decay than **5a** (35%) and **1a**. The PS **1a** presented the lowest DPBF decay (24%) being the decay significantly lower than that of the **5a** (ANOVA,  $p > 0.05$ ).



**Figure 2.4** – Singlet oxygen generation by porphyrins **1a** – **5a** assessed by the relative photodegradation of DPBF (50  $\mu\text{M}$ ) in DMF/H<sub>2</sub>O (9:1) upon 15 min of irradiation with white light filtered through a cut-off filter for wavelengths below 540 nm (9.0 mW cm<sup>-2</sup>) with or without PS (0.5  $\mu\text{M}$ ). Values correspond to the average of two independent experiments. Error bars represent

#### 2.3.4 Photosensitizer binding

The values of cationic porphyrins binding (**1a** – **5a**) to *E. coli* after 15 min of incubation in the dark at a concentration of 5.0  $\mu\text{M}$  are summarized in Figure 2.5. PS **1a** showed the highest amount of porphyrin retention in *E. coli* cells, with an average value of  $6.92 \times 10^6$  molecules CFU<sup>-1</sup> followed by PS **2a** ( $1.58 \times 10^5$  molecules CFU<sup>-1</sup>). PSs **4a** and **5a** presented similar values of porphyrin retention ( $5.62 \times 10^4$  and  $5.37 \times 10^4$  molecules CFU<sup>-1</sup>, respectively) (ANOVA,  $p < 0.05$ ). While, PS **3a** showed the lower retention being recovered only  $1.45 \times 10^4$  molecules CFU<sup>-1</sup>.

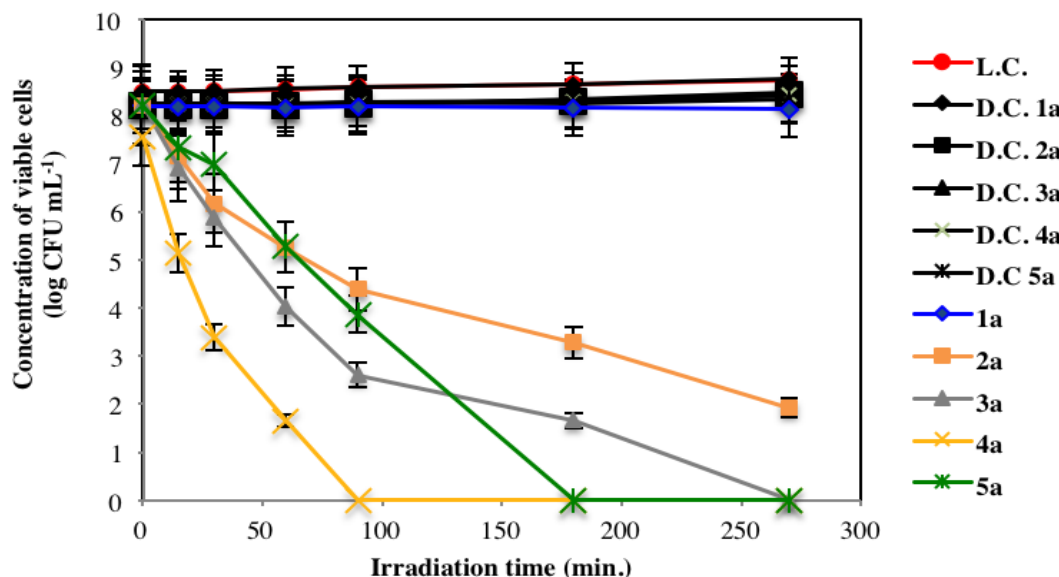


**Figure 2.5** - Molecules of cationic porphyrins **1a** – **5a** that bind to *E. coli* cells after 15 min of incubation in the dark at room temperature at the concentration of 5.0  $\mu$ M. Values correspond to the average of three independent experiments. Error bars represent standard deviation.

### 2.3.5 Photoinactivation assays of *E. coli*

The results of the photoinactivation experiments show that the viability of *E. coli* was not affected neither by light alone (light control) nor by the direct effect of any of the tested PS (dark controls) (Fig. 2.6). Significant differences between the independent assays conducted for each porphyrin were not found (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Comparing the bacterial reduction values obtained in the experiments, a clear difference in the photoinactivation patterns of the five porphyrins was observed, following the order **1a** (mono charged) < **2a** < **3a** (two charged) < **5a** (tetra charged) < **4a** (tri charged). The tri-cationic PS **4a** was the most efficient (ANOVA,  $p < 0.05$ ), reducing of *E. coli* to the detection limit of the method ( $\sim 8.0$  log of reduction), after 90 min of irradiation. After 30 min of irradiation in the presence of **4a** the decreasing viability was of  $\sim 4.0$  log. The tetra-cationic derivative **5a** was the second most efficient PS, reducing the *E. coli* to the detection limit after 180 min of irradiation ( $\sim 8.0$  log of reduction). The reduction to  $\sim 4.0$  log was only observed after 90 min of irradiation. However, the efficiency of this PS was significantly higher than that observed for the di-cationic **3a**, where the reduction until the detection limits was only observed after 270 min. of irradiation ( $\sim 8.0$  log of reduction). The viability reduction to 4.0 log was observed after 90 min. of irradiation. The **2a**, a di-cationic PS with the positive charge distributed in opposite positions on the macrocycle, did not reduce the *E. coli* to the

detection limit after 270 min of irradiation, remaining  $\sim 2.0$  log of viable cell. However, the efficiency of inactivation of this PS was significantly higher than that of the **1a**. This mono-charged PS did not reduce the bacteria at all. The results of this PS were similar (ANOVA,  $p > 0.05$ ) to those observed for light and dark controls.



**Figure 2.6** – Variation of viability of *E. coli* after exposure to 5.0  $\mu\text{M}$  of PS (**1a** – **5a**) and irradiated with white light (380 – 700 nm) with an irradiance of 40  $\text{W m}^{-2}$  during 270 min. Values correspond to the average of two independent experiments. Error bars indicate the standard deviation and lines just combine the points.

## 2.4 Discussion

Knowing that PDI efficiency depends on the PS nature, it is important to identify which PS characteristics increase the photocytotoxic activity in order to improve the design of the PS and to decide about the best conditions for microbial photoinactivation. Although it is well known that (1) the modulation of the number of positive charges on the PS, (2) the asymmetric charge distribution at the peripheral position of the PS and (3) the introduction of aromatic hydrocarbon side groups highly lipophilic are key features that must be taken into account in the design of a PS,<sup>33,78,123,128,132-134</sup> it is difficult to evaluate the individual importance of each one.

In this study, five cationic porphyrins (**1a** – **5a**; mono- to tetra-cationic) were used to evaluate the charge number effect in the PDI of *E. coli*. Results showed distinct behaviours depending on the number of positive charges present in the molecule. The low

solubility in water of the monocationic PS **1a**, which results consequently into aggregation phenomena and low singlet oxygen generation, can be the reason why this compound presented no photoinactivation effect against *E. coli*, even after 270 min of irradiation. In fact, it is well known the key role of singlet oxygen in the photoinactivation efficiency. According to the literature, this reactive oxygen specie is the pathway by which the PS exerts its photodynamic action.<sup>59,135-137</sup> However, this is only one of the determining factors in the PDI efficiency. Its behaviour in the medium surrounding the cell is another important aspect. Aggregation phenomena, in the surrounding cell medium, can lead to a decrease of efficiency once the PS is no longer available to the cell.<sup>107,131</sup> Since it is no longer in its monometric form and the singlet oxygen production diminishes drastically in the presence of aggregation phenomena.<sup>138</sup>

An interesting effect was seen when two positive charges are added to the PS. In this case, the charge distribution has a clear influence in the PDI efficiency. Although both adjacent (**3a**) and opposite (**2a**) charged di-cationic PS presented similar singlet oxygen generation, the PS **3a** showed to be a more efficient PS leading to inactivation until the limit of detection. However, this result was not completely supported by the binding results once, the opposite PS **2a** ( $1.58 \times 10^5$  molecules CFU<sup>-1</sup>) presented higher amount of PS retained by the *E. coli* than the adjacent PS **3a** ( $1.45 \times 10^4$  molecules CFU<sup>-1</sup>). The amount of PS that is retained by the bacterial cells is one crucial parameter. Due to the singlet oxygen short lifetime, in the order of microseconds, PS must be close enough to the bacterial membrane or even inside the cell, to cause efficient cell damage.<sup>114</sup> However some aggregation phenomena could be behind this slight higher retention by the opposite di-cationic PS **2a**. Despite no aggregation phenomenon has been observed when the solubility studies were performed; both compounds follow the Beer-Lambert law, there may be a time-dependent aggregation phenomena which justify the relative higher molecules retention of **2a** by the cells and a lower PDI efficiency. In fact, the distribution of the charges in the porphyrin structure affects the PDI efficiency.<sup>103,129</sup> According to the results of Kessel et al. (2003) on the photodynamic efficiency of two dicationic porphyrins that varying in charge distribution on Murine L 1210 cells, the higher effect of the dicationic PS with adjacent charge distribution should result of the molecular distortion due to electrostatic repulsion caused by the asymmetric cationic molecule. In contrast, the porphyrin with the two opposite positive charges is a much more symmetric molecule.

Alves et al (2008) studied also the photodynamic efficiency of other two dicationic porphyrins varying in charge distribution on *E. coli* and *Enterococcus faecalis* and obtaining similar results; the PS with adjacent charge distribution was significantly more effective than the one with opposite charge in the inactivation of both bacteria.<sup>103</sup>

This study showed once again that tri- (**4a**) and tetra-cationic (**5a**) PS are more efficient in the inactivation of *E. coli* leading to total inactivation after 90 and 180 min of irradiation, respectively. Despite the lower singlet oxygen generation compared to both dicationic PS and the amount of PS retained by bacterial cells to be in the same order of magnitude, the efficiency on the *E. coli* photoinactivation is highest, which seems to point out that the localization of the PS in the bacterial cell plays a major role. Although it has been shown that molecular charge is important in determining antibacterial activity<sup>36,82,108,134</sup> as cationic compounds are taken up through the so called self-promoted uptake pathway,<sup>139,140</sup> the increase in the number of charges increases the PS affinity to the bacteria, which helps a better retention in the cells. The cationic molecules have a 2 – 4 orders of magnitude higher affinity to binding sites on surface LPS molecules of Gram negative bacteria than the divalent cations  $\text{Ca}^{2+}$  as  $\text{Mg}^{2+}$ , and they competitively displace these cations. The displacing of  $\text{Ca}^{2+}$  as  $\text{Mg}^{2+}$  leads to a reorganization of the outer membrane structure and permeabilization of the outer membrane.<sup>141</sup> Lopes et al (2014) using the PS **1a-5a** showed that lipid oxidation of *E. coli* is one of the changes induced by the photoinactivation process and the variation of the relative content of the fatty acyl composition observed after photosensitization is dependent of the PS used. They found a correlation between the PS efficiency and the decrease in the percentage of unsaturated fatty acids.<sup>142</sup> As mentioned before, the insertion of functional groups in the peripheral positions of the tetrapyrrole macrocycle (*meso* positions) may transform them into cationic entities, increasing their photocytotoxic activity, but they may also confer other characteristics, such as hydrophobic, hydrophilic or amphiphilic character, to the PS that can be relevant in the outcome of the photosensitization process.<sup>64</sup> Hydrophobic PS can more easily diffuse across the cell membrane and improve the efficiency of the photodynamic effect. However, at the same time PS must be in solution, needing a hydrophilic character. So, the ideal PS must possess both hydrophilic and hydrophobic, *i.e.* present an amphiphilic behaviour. The increase in the amphiphilic character of the PS enhance its affinity for bacteria,<sup>123,124</sup> increasing the PDI efficiency.<sup>78</sup> In fact the



amphiphilic Ps **4a** is more efficient than hydrophilic Ps **5a** to photoinactivate *E. coli* and the lipophilic character of the *meso*-substituent groups may be relevant in the outcome of the photodynamic process.

## 2.5 Conclusion

This work confirms the relevance of the number and charge position on the porphyrin macrocycle to photoinactivate *E. coli*. The number and position of the charges have a clear effect on the overall efficiency of the PDI process. Overall, the tested molecules showed distinct efficiency on photosensitization, being the less effective the PS **1a** and **2a** and the more effective the tetra-cationic PS **5a**, the di-cationic PS with charge distribution in the adjacent positions **3a** and the tri-cationic derivative **4a**. The interactions between the cationic PS and the *E. coli* seems to be more dependent of the amphiphilic character of the PS than the singlet oxygen generation or PS retention by the bacterial cells. Consequently, it is important to consider the charge distribution when it is design new PS in particular considering *E. coli* photoinactivation. It is done an important step in order to establish and understand in more detail the structure-activity relationships that drive the PDI efficiency.



## REFERENCES

---





1. Milgron, L.R., ed. *The Colours of Life: An introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds*. ed. O. University. 1997.
2. Kain, W.S., B., ed. *Inorganic Elements in the Chemistry of Life*. ed. B. Chemistry. 1994, John Wiley & Sons: New York.
3. Smith, K.M., *Porphyrins and Metalloporphyrins*, K.M. Smith, Editor. 1975, Elsevier: Amsterdam.
4. Bonnett, R., ed. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. ed. A.C. Texts. 2000, Gordon and Breach Science London.
5. Rothmund, P., *Porphyrin Studies. III.1 The Structure of the Porphine<sup>2</sup> Ring System*. *Journal of the American Chemical Society* **1939**, 61 (10), 2912-2915.
6. Ball, R. H.; Dorough, G. D.; Calvin, M., *A Further Study of the Porphine-like Products of the Reaction of Benzaldehyde and Pyrrole*. *Journal of the American Chemical Society* **1946**, 68 (11), 2278-2281.
7. Badger, G.; Jones, R.; Laslett, R., *Porphyrins. VII. The synthesis of porphyrins by the Rothmund reaction*. *Australian Journal of Chemistry* **1964**, 17 (9), 1028-1035.
8. Adler, A.D., F.R. Longo, and W. Shergalis, *Mechanistic Investigations of Porphyrin Syntheses. I. Preliminary Studies on ms-Tetraphenylporphin*. *Journal of the American Chemical Society*, **1964**, 86(15), 3145-3149.
9. Lindsey, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M., *Rothmund and Adler-Longo reactions revisited: synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions*. *The Journal of Organic Chemistry* **1987**, 52 (5), 827-836
10. Gonsalves, A.; Pereira, M. M., *A new look into the Rothmund meso- tetraalkyl and tetraarylporphyrin synthesis*. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1985**, 22 (3), 931-933.
11. Gonsalves, A.; Varejao, J.; Pereira, M. M., *Some new aspects related to the synthesis of meso-substituted porphyrins*. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1991**, 28 (3), 635-640.
12. Wijesekera, T. P.; Dolphin, D., *Some preparations and properties of porphyrins*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1985**, 193, 229-266.
13. Solladié, N., A. Hamel, and M. Gross, *Synthesis of multiporphyrinic  $\alpha$ -polypeptides: towards the study of the migration of an excited state for the mimicking of the natural light harvesting device*. *Tetrahedron Letters*, **2000**. 41(32), 6075-6078.
14. Istrum-Acevedo, J. H.; Brennaman, M. K.; Meyer, T. J., *Chemical approaches to artificial photosynthesis. 2*. *Inorganic Chemistry* **2005**, 44 (20), 6802-6827.

15. Linke-Schaetzel, M.; Bhise, A. D.; Gliemann, H.; Koch, T.; Schimmel, T.; Balaban, T. S., *Self-assembled chromophores for hybrid solar cells*. Thin Solid Films **2004**, 451–452, 16-21.
16. Meunier, B., Robert, A., Pratviel, G., Bernadou, J., *Metalloporphyrins in catalytic oxidations and oxidative DNA*. In The Porphyrin Handbook, KM Kadish K. M., S., R. Guillard, Ed. 2000; Vol. 4.
17. Korotchenko, V. N.; Severin, K.; Gagne, M. R., *The aerobic oxidation of alcohols with a ruthenium porphyrin catalyst in organic and fluorinated solvents*. Organic & Biomolecular Chemistry **2008**, 6 (11), 1961-1965.
18. Murakami, Y.; Kikuchi, J.; Hisaeda, Y.; Hayashida, O., *Artificial enzymes*. Chemical Reviews **1996**, 96 (2), 721-758.
19. Reyes-Ortega, Y.; Alvarez-Toledano, C.; Ramirez-Rosales, D.; Sanchez-Sandoval, A.; Gonzalez-Vergara, E.; Zamorano-Ulloa, R., *Pinch-porphyrins, new spectroscopic and kinetic models of peroxidases*. Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions **1998**, (4), 667-674.
20. Imahori, H. and S. Fukuzumi *Porphyrin- and Fullerene-Based Molecular Photovoltaic Devices* Advanced Functional Materials 2004, 14(6), 525-536..
21. Wang, Q.M. and Bruce, D.W. *Synthesis of calamitic, liquid crystalline porphyrins with lateral aromatic branches* Tetrahedron Letters **1996**, 37 (42), 7641-7644.
22. Arunkumar, C.; Bhyrappa, P.; Varghese, B., *Synthesis and axial ligation behaviour of sterically hindered Zn(II)-porphyrin liquid crystals*. Tetrahedron Letters **2006**, 47 (46), 8033-8037.
23. Purrello, R.; Gurrieri, S.; Lauceri, R. *Porphyrin assemblies as chemical sensors*. Coordination Chemistry Reviews **1999**, 190-192, 683-706.
24. Wagner, R.W. and J.S. Lindsey, *A Molecular Photonic Wire*. Journal of the American Chemical Society **1994**, 116 (21), 9759-9760.
25. Koepf, M.; Trabolsi, A.; Elhabiri, M.; Wytko, J. A.; Paul, D.; Albrecht-Gary, A. M.; Weiss, J., *Building blocks for self-assembled porphyrinic photonic wires*. Organic Letters **2005**, 7 (7), 1279-1282.
26. Ambroise, A.; Kirmaier, C.; Wagner, R. W.; Loewe, R. S.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Lindsey, J. S., *Weakly coupled molecular photonic wires: Synthesis and excited-state energy-transfer dynamics*. Journal of Organic Chemistry **2002**, 67 (11), 3811-3826.
27. Jemli, M.; Alouini, Z.; Sabbahi, S.; Gueddari, M., *Destruction of fecal bacteria in wastewater by three photosensitizers*. Journal of Environmental Monitoring **2002**, 4 (4), 511-516.

28. Bonnett, R.; Krysteva, M. A.; Lalov, I. G.; Artarsky, S. V., *Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan*. Water Research **2006**, 40 (6), 1269-1275.
29. Carvalho, C. M. B.; Gomes, A. T. P. C.; Fernandes, S. C. D.; Prata, A. C. B.; Almeida, M. A.; Cunha, M. A.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Lin, Z.; Rainho, J. P.; Rocha, J., *Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial  $\beta$ -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **2007**, 88 (2–3), 112-118.
30. Costa, L.; Alves, E.; Carvalho, C. M. B.; Tome, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, A., *Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect*. Photochemical & Photobiological Sciences **2008**, 7 (4), 415-422.
31. Nishide, H.; Suzuki, T.; Kawakami, H.; Tsuchida, E., *Cobalt porphyrin-Mediated Oxygen Transport in a Polymer Membrane: Effect of the Cobalt porphyrin Structure on the Oxygen-Binding Reaction, Oxygen-Diffusion Constants, and Oxygen-Transport Efficiency*. The Journal of Physical Chemistry **1994**, 98 (19), 5084-5088.
32. Trannoy, L. L.; Lagerberg, J. W. M.; Dubbelman, B.; Schuitmaker, H. J.; Brand, A., *Positively charged porphyrins: a new series of photosensitizers for sterilization of RBCs*. Transfusion, **2004**, 44 (8), 1186-1196.
33. Banfi, S.; Caruso, E.; Buccafurni, L.; Battini, V.; Zazzaron, S.; Barbieri, P.; Orlandi, V., *Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria*. . Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **2006**, 85 (1), 28-38.
34. Wainwright, M., *Local treatment of viral disease using photodynamic therapy*. International Journal of Antimicrobial Agents **2003**, 21 (6), 510-520.
35. Hamblin, M.R. and T. Hasan, *Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?* Photochemical & Photobiological Sciences, **2004**. 3(5), 436-450.
36. Demidova, T.N. and M.R. Hamblin, *Effect of cell-photo sensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **2005**. 49(6), 2329-2335.
37. Calzavara-Piton, P., Szeimeies, R-M, Ortel, B., *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology in Comrehensive Series in Photosciences*. 2001: Amesterdam.
38. Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X. H.; Childs, C. J. H.; Sibata, C. H., *Photosensitizers in clinical PDT*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy **2004**, 1 (1), 27-42.

39. Jori, G., Perria, C., ed. *Photodiagnostic and phototrreapeutic techiques in medicin*. 1995, Documento Editoriale srl: Milano.
40. Raab, O., *Effect of fluorescent substances on Infusoria*. Zeitschrift Fur Biologie **1900**, 39, 524-546.
41. Gilbert, A., Baggot, J., ed. *In Essentials of Molecular Photochemistry*. 1991, Oxford Scientific: Oxford.
42. Radek, J., ed. *Mechanisms of Photophysical Processes and Photochemical Reactions in Polymers*. Theory and applications ed. J.W. Sons. 1987.
43. Guillet, J., ed. *Polymer Photophysics and Photochemistry an Introdyction to the Study of Photoprocess in Macromolecules*. 1985, Cambridge University Press: Cambridge.
44. Turro, N.J., *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books, 1991.
45. Lakowicz, J.R., ed. *Principles of Flourescence Spectroscopy*. ed. Kluwer. Vol. 2. 1999, Academic/Plenum: New York.
46. [http://www.rockefeller.edu/spectroscopy/flouresence2\\_pop.php](http://www.rockefeller.edu/spectroscopy/flouresence2_pop.php) Online 10Dez2014
47. Machado, A.E.H., *Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Prespectivas*. Química Nova **1999**, 23, 237-243.
48. Bonnett, R., *Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series of Photodynamic Therapy*. Chemical Society Reviews **1995**. 24, 19-33.
49. Sternberg, E.D., D. Dolphin, and C. Bruckner, *Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy*. Tetrahedron, **1998**, 54(17): p. 4151-4202.
50. McCaughan, J.S., *Photodynamic therapy - A review*. Drugs & Aging, **1999**. 15(1), 49-68.
51. Tetsuya, *Pre-operative PDT for lung cancer*. Photodynamics News, **1999**. 15(1), 1461.
52. Awan, M. A. and S. A. Tarin (2006). "Review of photodynamic therapy." Surgeon-Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland 4(4): 231-236.
53. Hoerauf, H., Huttman, G., Diddens, H., Laqua, H., *Photodynamic therapy of eyelid basalioma after topical administration of delta-aminolevulinic acid*. Ophthalmology, **1994**. 91(6), 824-829.
54. Sickenberg, M.; Schmidt-Erfurth, U.; Miller, J. W.; Pournaras, C. J.; Zografos, L.; Piguet, B.; Donati, G.; Laqua, H.; Barbazetto, I.; Gragoudas, E. S.; Lane, A. M.; Birngruber, R.; van den Bergh, H.; Strong, H. A.; Manjuris, U.; Gray, T.; Fsadni, M.; Bressler, N. M., *A preliminary study of photodynamic therapy using verteporfin for choroidal neovascularization in pathologic myopia, ocular histoplasmosis syndrome,*



angioid streaks, and idiopathic causes. Archives of Ophthalmology **2000**, 118 (3), 327-336.

55. Mulroney, C.M., S. Gluck, and A.D. Ho, *The use of photodynamic therapy in bone-marrow purging*. Seminars in Oncology, **1994**. 21(6), 24-27.

56. Kim, R. Y.; Hu, L. K.; Foster, B. S.; Gragoudas, E. S.; Young, L. H. Y., *Photodynamic therapy of pigmented choroidal melanomas of greater than 3-mm thickness*. Ophthalmology **1996**, 103 (12), 2029-2036.

57. Turnbull, R. C.; Chen, J. C.; Labow, R. S.; Margaron, P.; Hsiang, Y. N., *Benzoporphyrin derivative monacid ring A (Verteporfin) alone has no inhibitory effect on intimal hyperplasia: In vitro and in vivo results*. Journal of Investigative Surgery **2000**, 13 (3), 153-159.

58. Maisch, T.; Szeimies, R. M.; Jori, G.; Abels, C., *Antibacterial photodynamic therapy in dermatology*. Photochemical & Photobiological Sciences **2004**, 3 (10), 907-917.

59. Maisch, T.; Szeimies, R. M.; Lehn, N.; Abels, C., *Antibacterial photodynamic therapy. A new treatment for bacterial skin diseases?* Hautarzt **2005**, 56 (11), 1048-1055.

60. Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M., *The history of photodetection and photodynamic therapy*. Photochemistry and Photobiology **2001**, 74 (5), 656-669.

61. Santamaria, L. and G. Prino, *List of the photodynamic substances*. Research progress in organic, biological and medicinal chemistry, **1972**. 3 Pt 1, XI-XXXV.

62. Oleinick, N.L., R.L. Morris, and T. Belichenko, *The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how*. Photochemical & Photobiological Sciences **2002**, 1(1), 1-21.

63. Brown, S.B., E.A. Brown, and I. Walker, *The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment*. Lancet Oncology **2004**. 5(8), 497-508.

64. Nyman, E.S. and P.H. Hynninen, *Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology **2004**. 73(1-2), 1-28.

65. Dickson, E.F.G., R.L. Goyan, and R.H. Pottier, *New directions in photodynamic therapy*. Cellular and Molecular Biology **2002**. 48(8): p. 939-954.

66. Simplicio, F.I., F. Maionchi, and N. Hioka, *Photodynamic therapy: Pharmacological aspects, applications and news from medications development*. Química Nova **2002**. 25(5), 801-807.

67. Banfi, S.; Caruso, E.; Caprioli, S.; Mazzagatti, L.; Canti, G.; Ravizza, R.; Gariboldi, M.; Monti, E., *Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells*. Bioorganic & Medicinal Chemistry **2004**, 12 (18), 4853-4860.



68. Maisch, T., *A New Strategy to Destroy Antibiotic Resistant Microorganisms: Antimicrobial Photodynamic Treatment*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, **2009**, 9(8), 974-983.
69. Livermore, D.M., *Antibiotic resistance in staphylococci*. International Journal of Antimicrobial Agents, **2000**, 16, S3-S10.
70. Hiramatsu, K.; Hanaki, H.; Ino, T.; Yabuta, K.; Oguri, T.; Tenover, F. C., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **1997**, 40 (1), 135-136.
71. Al-Rawahi, G. N.; Reynolds, S.; Porter, S. D.; Forrester, L.; Kishi, L.; Chong, T.; Bowie, W. R.; Doyle, P. W., *Community-Associated CmrSA-10 (UstA-300) Is The Predominant Strain Among Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains Causing Skin, And Soft Tissue Infections In Patients Presenting To The Emergency Department Of A Canadian Tertiary Care Hospital*. Journal of Emergency Medicine **2010**, 38 (1), 6-11.
72. Witte, W.; Bräulke, C.; Cuny, C.; Strommenger, B.; Werner, G.; Heuck, D.; Jäpe, U.; Wendt, C.; Linde, H. J.; Harmsen, D., *Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **2005**, 24 (1), 1-5.
73. Poole, K., *Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms*. Annals of Medicine, **2007**, 39(3), 162-176.
74. Wright, G.D., *Mechanisms of resistance to antibiotics*. Current Opinion in Chemical Biology **2003**, 7(5), 563-569.
75. Tenover, F.C., *Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria*. The American Journal of Medicine, **2006**, 119 6(A), 3-10
76. Bertolini, G.; Rossi, F.; Valduga, G.; Jori, G.; Vanlier, J., *Photosensitizing activity of water-soluble and lipid-soluble phthalocyanines on escherichia-coli*. FEMS Microbiology Letters **1990**, 71 (1-2), 149-155.
77. Merchat, M.; Bertolini, G.; Giacomini, P.; Villanueva, A.; Jori, G., *Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology **1996**, 32 (3), 153-157.
78. Caminos, D. A.; Spesia, M. B.; Durantini, E. N., *Photodynamic inactivation of Escherichia coli by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups*. Photochemical & Photobiological Sciences **2006**, 5 (1), 56-65.
79. Kuznetsova, N. A.; Makarov, D. A.; Kaliya, O. L.; Vorozhtsov, G. N., *Photosensitized oxidation by dioxygen as the base for drinking water disinfection*. Journal of Hazardous Materials **2007**, 146 (3), 487-491.

80. Dahl, T.A., W.R. Midden, and P.E. Hartman, *Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen*. Journal of Bacteriology **1989**, 171(4), 2188-2194.
81. Ergaieg, K. and R. Seux, *A comparative study of the photoinactivation of bacteria by meso-substituted cationic porphyrin, rose Bengal and methylene blue*. Desalination, **2009** 246(1-3), 353-362.
82. Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Parish, J. H.; Brown, S. B., *Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2000**, 44 (3), 522-527.
83. Jori, G.; Fabris, C.; Soncin, M.; Ferro, S.; Coppelotti, O.; Dei, D.; Fantetti, L.; Chiti, G.; Roneucci, G., *Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications*. Lasers in Surgery and Medicine **2006**, 38 (5), 468-481.
84. Scherrer, R. and P. Gerhardt, *Molecular sieving by bacillus-megaterium cell wall and protoplast*. Journal of Bacteriology, **1971**. 107(3), 718.
85. Friedrich, C. L.; Moyles, D.; Beveridge, T. J.; Hancock, R. E. W., *Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2000**, 44 (8), 2086-2092.
86. Russell, A.D., *Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics and biocides*. Progress in Medicinal Chemistry 35, 1998. 35: p. 133-197.
87. Nikaido, H. and M. Vaara, *Molecular-basis of bacterial outer-membrane permeability*. Microbiological Reviews, **1985**. 49(1), 1-32.
88. Yoshimura, F. and H. Nikaido, *Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of escherichia-coli k-12*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **1985**. 27(1), 84-92.
89. Bertoloni, G.; Lauro, F. M.; Cortella, G.; Merchat, M., *Photosensitizing activity of hematoporphyrin on Staphylococcus aureus cells*. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects **2000**, 1475 (2), 169-174.
90. Fiel, R. J.; Dattagupta, N.; Mark, E. H.; Howard, J. C., *Induction of dna damage by porphyrin photosensitizers*. Cancer Research 1981, 41 (9), 3543-3545.
91. Menezes, S., M.A.M. Capella, and L.R. Caldas, *Photodynamic-action of methylene-blue - repair and mutation in escherichia-coli*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology 1990, 5(3-4), 505-517.

92. Capella, M., A.M. Coelho, and S. Menezes, *Effect of glucose on photodynamic action of methylene blue in Escherichia coli cells*. Photochemistry and Photobiology **1996**, 64(1), 205-210.
93. Hamblin, M. R.; O'Donnell, D. A.; Murthy, N.; Contag, C. H.; Hasan, T., *Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging*. Photochemistry and Photobiology **2002**, 75 (1), 51-57.
94. Hass, B.S. and R.B. Webb, *Photodynamic effects of dyes on bacteria .3. mutagenesis by acridine-orange and 500-nm monochromatic light in strains of escherichia-coli that differ in repair capability*. Mutation Research **1979**, 60(1) 1-11.
95. Imray, F.P. and D.G. Macphee, *Role of dna-polymerase i and rec system in survival of bacteria and bacteriophages damaged by photodynamic action of acridine-orange*. Molecular & General Genetics **1973**, 123(4), 289-298.
96. Schafer, M., C. Schmitz, and G. Horneck, *High sensitivity of Deinococcus radiodurans to photodynamically-produced singlet oxygen*. International Journal of Radiation Biology **1998**, 74(2)249-253.
97. Valduga, G.; Breda, B.; Giacometti, G. M.; Jori, G.; Reddi, E., *Photosensitization of wild and mutant strains of Escherichia coli by meso-tetra (N-methyl-4-pyridyl)porphine*. Biochemical and Biophysical Research Communications 1999, 256 (1), 84-88.
98. Nitzan, Y.; Gutterman, M.; Malik, Z.; Ehrenberg, B., *Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins*. Photochemistry and Photobiology **1992**, 55 (1), 89-96.
99. Pereira, M. A.; Faustino, M. A. F.; Tome, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, A., *Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin*. Photochemical & Photobiological Sciences **2014**, 13 (4), 680-690.
100. Almeida, A.; Cunha, A.; Faustino, M. A. F.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S., *Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents, Photodynamic inactivation of microbial pathogens*. In Medical and environmental applications, Michael R. Hamblin and Giulio Jori: 2010.
101. Wainwright, M., *Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **1998**, 42 (1), 13-28.
102. Nowis, D.; Makowski, M.; Stoklosa, T.; Legat, M.; Issat, T.; Golab, J., *Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy*. Acta Biochimica Polonica **2005**, 52 (2), 339-52.
103. Alves, E.; Carvalho, C. M. B.; Tome, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Mendo, S.; Almeida, A., *Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent Escherichia coli by cationic porphyrins under*

*artificial and solar irradiation*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **2008**, 35 (11), 1447-1454.

104. Costa, L.; Carvalho, C. M. B.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tome, J. P. C.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, A., *Sewage bacteriophage inactivation by cationic porphyrins: influence of light parameters*. Photochemical & Photobiological Sciences **2010**, 9 (8), 1126-1133.

105. Nitzan, Y. and H. Ashkenazi, *Photoinactivation of Deinococcus radiodurans: An unusual gram-positive microorganism*. Photochemistry and Photobiology **1999**, 69(4), 505-510.

106. Nitzan, Y. and H. Ashkenazi, *Photoinactivation of Acinetobacter baumannii and Escherichia coli B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths*. Current Microbiology **2001**, 42(6), 408-414.

107. Costa, D. C. S.; Gomes, M. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Cunha, A.; Cavaleiro, J. A. S.; Almeida, A.; Tome, J. P. C., *Comparative photodynamic inactivation of antibiotic resistant bacteria by first and second generation cationic photosensitizers*. Photochemical & Photobiological Sciences **2012**, 11 (12), 1905-1913.

108. Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C. M. B.; Tome, J. P. C.; Faustino, M. A.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, A., *Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins*. BMC Microbiology 2009, 9/XXX.

109. Alves, E.; Rodrigues, J. M. M.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Cavaleiro, J. A. S.; Lin, Z.; Cunha, A.; Nadais, M. H.; Tome, J. P. C.; Almeida, A., *A new insight on nanomagnet-porphyrin hybrids for photodynamic inactivation of microorganisms* Dyes and Pigments **2014**, 110, 80-88.

110. Soukos, N. S.; Ximenez-Fyvie, L. A.; Hamblin, M. R.; Socransky, S. S.; Hasan, T., *Targeted antimicrobial photochemotherapy*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **1998**, 42 (10), 2595-2601.

111. Maisch, T.; Bosl, C.; Szeimies, R. M.; Lehn, N.; Abels, C., *Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2005**, 49 (4), 1542-1552.

112. Soukos, N.S., Wilson, M., Burns, T., Speight, P. M., *Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and Streptococcus sanguis evaluated in vitro*. Lasers in Surgery and Medicine, **1996**. 18: p. 253-259.

113. Merchat, M.; Bertolini, G.; Giacomini, P.; Villanueva, A.; Jori, G., *Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology **1996**, 32 (3), 153-157.



114. Preuss, A.; Zeugner, L.; Hackbarth, S.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Cavaleiro, J. A. S.; Roeder, B., *Photoinactivation of Escherichia coli (SURE2) without intracellular uptake of the photosensitizer*. Journal of Applied Microbiology **2013**, 114 (1), 36-43.
115. Lambrechts, S.A.G., M.C.G. Aalders, and J. Van Marle, *Mechanistic study of the photodynamic inactivation of candida albicans by a cationic porphyrin*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2005**, 49(5), 2026-2034.
116. Kosaka, S.; Akilov, O. E.; O'Riordan, K.; Hasan, T., *A mechanistic study of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis*. Journal of Investigative Dermatology **2007**, 127 (6), 1546-1549..
117. Costa, L.; Tome, J. P. C.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Faustino, M. A. F.; Cunha, A.; Gomes, N. C. M.; Almeida, A., *Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT*. Antiviral Research **2011**, 91 (3), 278-282.
118. Prates, R. A.; Fuchs, B. B.; Mizuno, K.; Naqvi, Q.; Kato, I. T.; Ribeiro, M. S.; Mylonakis, E.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R., *Effect of Virulence Factors on the Photodynamic Inactivation of Cryptococcus neoformans*. PLoS One **2013**, 8 (1).
119. Carvalho, C. M. B.; Alves, E.; Costa, L.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Almeida, A.; Cunha, Â.; Lin, Z.; Rocha, J., *Functional Cationic Nanomagnet–Porphyrin Hybrids for the Photoinactivation of Microorganisms*. ACS Nano **2010**, 4 (12), 7133-7140.
120. Costa, L.; Faustino, M. A.; Neves, M. G.; Cunha, A.; Almeida, A., *Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages*. Viruses **2012**, 4 (7), 1034-1074.
121. Arrojado, C.; Pereira, C.; Tome, J. P.; Faustino, M. A.; Neves, M. G.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A.; Cunha, A.; Calado, R.; Gomes, N. C.; Almeida, A., *Applicability of photodynamic antimicrobial chemotherapy as an alternative to inactivate fish pathogenic bacteria in aquaculture systems*. Photochemical & Photobiological Sciences **2011**, 10 (10), 1691-1700.
122. Biel, M.A., *Photodynamic therapy of bacterial and fungal biofilm infections*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), **2010**. 635, 175-94.
123. Boyle, R.W. and D. Dolphin, *Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers*. Photochemistry and Photobiology **1996**, 64(3), 469-485.
124. azzeri, D.; Rovera, M.; Pascual, L.; Durantini, E. N., *Photodynamic studies and photoinactivation of Escherichia coli using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution*. Photochemistry and Photobiology **2004**, 80 (2), 286-293.

125. Bonnett, R.; Buckley, D. G.; Burrow, T.; Galia, A. B. B.; Saville, B.; Songca, S. P., *Photobactericidal materials based on porphyrins and phthalocyanines*. Journal of Materials Chemistry **1993**, 3 (3), 323-324.
126. Jori, G. and S.B. Brown, *Photosensitized inactivation of microorganisms*. Photochemical & Photobiological Sciences, **2004**, 3(5), 403-405.
127. Ehrenberg, B.; Malik, Z.; Nitzan, Y.; Ladan, H.; Johnson, F.; Hemmi, G.; Sessler, J., *The binding and photosensitization effects of tetrabenzoporphyrins and texaphyrin in bacterial cells*. Lasers in Medical Science **1993**, 8 (3), 197-203.
128. Spesia, M. B.; Lazzeri, D.; Pascual, L.; Rovera, M.; Durantini, E. N., *Photoinactivation of Escherichia coli using porphyrin derivatives with different number of cationic charges*. FEMS Immunology and Medical Microbiology **2005**, 44 (3), 289-95.
129. Kessel, D., R. Luguya, and M.G.H. Vicente, *Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distribution*. Photochemistry and Photobiology **2003**, 78(5), 431-435.
130. Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Soncin, M.; Magaraggia, M.; Ferro, S.; Jori, G., *Synthesis and Antibacterial Activity of New Poly-S-lysine–Porphyrin Conjugates*. Journal of Medicinal Chemistry **2004**, 47 (26), 6649-6652.
131. Gomes, M. C., Woranovicz-Barreira, S. M.; Faustino, M. A.; Fernandes, R.; Neves, M. G.; Tome, A. C.; Gomes, N. C.; Almeida, A.; Cavaleiro, J. A.; Cunha, A.; Tome, J. P., *Photodynamic inactivation of Penicillium chrysogenum conidia by cationic porphyrins*. Photochemical & Photobiological Sciences **2011**, 10 (11), 1735-43.
132. Ando, A. and I. Kumadaki, *Progress on the syntheses of fluorine analogs of natural porphyrins potentially useful for the diagnosis and therapy of certain cancers*. J. Fluorine Chemistry **1999**, 100(1-2), 135-146.
133. Grancho, J. C.; Pereira, M. M.; Miguel Mda, G.; Rocha, G. A.; Burrows, H. D., *Synthesis, spectra and photophysics of some free base tetrafluoroalkyl and tetrafluoroaryl porphyrins with potential applications in imaging*. Photochemistry and Photobiology **2002**, 75 (3), 249-526.
134. Caminos, D.A. and E.N. Durantini, *Photodynamic inactivation of Escherichia coli immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2006**, 14(12), 4253-4259.
135. Nitzan, Y., B. Shainberg, and Z. Malik, *The mechanism of photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus by deuteroporphyrin*. Current Microbiology **1989**, 19(4), 265-269.

136. Müller-Breitkreutz, K.; Mohr, H.; Briviba, K.; Sies, H., *Inactivation of viruses by chemically and photochemically generated singlet molecular oxygen*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **1995**, 30 (1), 63-70.
137. Ragàs, X., M. Agut, and S. Nonell, *Singlet oxygen in Escherichia coli: New insights for antimicrobial photodynamic therapy*. Free Radical Biology and Medicine, **2010** 49(5), 770-776.
138. Ragàs, X.; He, X.; Agut, M.; Roxo-Rosa, M.; Gonsalves, A.; Serra, A.; Nonell, S., *Singlet Oxygen in Antimicrobial Photodynamic Therapy: Photosensitizer-Dependent Production and Decay in E. coli*. Molecules **2013**, 18 (3), 2712-2725.
139. Falla, T., D. Karunaratne, and R. Hancock, *Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin*. Journal of Biological Chemistry **1996**, 271, 19298-19303.
140. Hancock, R., *Alterations in outer membrane permeability*. Annual Review Microbiology **1984**, 38, 237-264.
141. Ehrenberg, B., Z. Malik, and Y. Nitzan, *Fluorescence spectral changes of hematoporphyrin derivative upon binding to lipid vesicles, Staphylococcus aureus and Escherichia coli cells*. Photochemistry and Photobiology **1985**, 41, 429-435.
142. Lopes, D.; Melo, T.; Santos, N.; Rosa, L.; Alves, E.; Clara Gomes, M.; Cunha, Â.; Neves, M. G. P. M. S.; Faustino, M. A. F.; Domingues, M. R. M.; Almeida, A., *Evaluation of the interplay among the charge of porphyrinic photosensitizers, lipid oxidation and photoinactivation efficiency in Escherichia coli*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **2014**, 141, 145-153.